

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA
Departamento de Biología Molecular

TESIS DOCTORAL



**PROCESOS INDUCIDOS EN LA CÉLULA DENDRÍTICA
TRAS LA FORMACIÓN DE LA SINAPSIS
INMUNOLÓGICA Y SUS EFECTOS SOBRE LA
ACTIVACIÓN TEMPRANA DEL LINFOCITO T**

Laura Gómez Cabañas

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

**PROCESOS INDUCIDOS EN LA CÉLULA DENDRÍTICA
TRAS LA FORMACIÓN DE LA SINAPSIS
INMUNOLÓGICA Y SUS EFECTOS SOBRE LA
ACTIVACIÓN TEMPRANA DEL LINFOCITO T**

Este trabajo ha sido realizado por **Laura Gómez Cabañas**, para optar al grado de Doctor, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), bajo la dirección del **Dr. José Luis Rodríguez Fernández**.



A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Ha sido mucho tiempo hasta llegar a este punto, pero por fin puedo decir... ¡lo conseguí! Conseguí aquello que veía tan lejos hace un tiempo, aquello que a veces pensaba que no llegaría nunca. Ha sido mucha la gente que me he ido encontrando a lo largo del camino, gente que ha creído en mí, que me ha apoyado y que ha estado a mi lado, así que ahora que se acaba esta etapa llega el momento de darles las gracias.

A pesar de que los comienzos fueron duros y tardé un poco en encontrar mi sitio, hice grandes amigos a los que tengo muchas cosas que agradecer. A Paco, por tener la paciencia de enseñarme todo lo que sabías y no desesperarte con mi torpeza y mis dudas de principiante. A María, por esas cenas de los viernes que nunca sabíamos dónde iban a acabar y por los buenos ratos que pasamos. A Yaima, porque aunque llegaste en un momento duro para mí siempre estuviste conmigo, escuchándome y dándome ánimos. A Óscar, por esos momentos de risas y desahogos en cultivos que tan bien nos venían, y porque allá donde esté siempre se acuerda un poquito de mí.

A Vero, qué decirte que no sepas ya. No sé qué habría hecho sin ti, sin tus consejos, sin tu ayuda... y no sólo en el laboratorio. Tener que despedirme de ti fue duro, pero da igual que estés en Argentina, en Suecia o donde sea, porque sé que por mucha distancia que haya siempre estás ahí.

El cambio de rumbo me hizo encontrarme con gente increíble. Son tantos que espero que me perdonen si me dejo alguno, mi memoria a estas alturas ya no es lo que era. A José Luis, gracias por hacerme un hueco en el laboratorio, por todo lo que he aprendido contigo, por los consejos, las anécdotas y los ánimos que nos das siempre cuando las cosas no van del todo bien. Estoy muy contenta de haber podido trabajar contigo, no hubiese podido tener un director mejor.

A Rubén, gracias por los buenos ratos, las sobremesas de todos los días, por tu ayuda, por tus ánimos cuando estaba de bajón y por todas las risas que nos hemos echado. Y Cris, sé que llegué en un momento tenso para ti, pero aún así siempre estuviste dispuesta a enseñarme y a ayudarme con todo, incluso ahora que estás en la otra punta del mundo lo sigues haciendo.

A Laura y Diego, mis argentinos favoritos, por los buenos ratos que hemos pasado y por los que espero que estén por llegar. A Bego y Noe, por esos desayunos y esas conversaciones que nos traíamos entre las tres. A Génesis, porque trajiste la alegría y la locura al laboratorio cuando llegaste, y ahora que te has ido esas luchas por el sol ya no son lo mismo. A Elisa, por los buenos ratos tanto dentro como fuera del trabajo. A Carmen, por esos buenos paseos y las conversaciones en el parque con Simber, Lagun y mi gordita, porque las tardes no son lo mismo sin vosotros.

A Pilar, porque llegaste cuando estaba sola y trajiste vida al laboratorio con tus despistes, tu orden y tus peculiaridades; gracias por ayudarme cuando lo he necesitado. Y por supuesto, a mis dos chicos de cultivos, Rubén y Alberto, y a Sofía, porque esos ratos en cultivos no los cambio por nada, con vosotros unos pocos metros cuadrados dan para mucho y son la mar de entretenidos. A Olga, por su apoyo en los momentos difíciles.

A Cristina, porque aunque siempre dices que no tengo que agradecerte nada, no es así, te mereces un gracias enorme. Siempre dispuesta a ayudarme, a escucharme y a dejar tus cosas de lado por mí. Eres una gran amiga, la mejor que se puede tener.

A Olga, porque eres mucho más que una amiga, eres como una hermana para mí, esa hermana mayor que me echa la bronca cuando me la tiene que echar, me abre los ojos y siempre está ahí cuando la necesito. Gracias por creer siempre en mí y animarme tanto, por las risas y los buenos momentos que pasamos juntas.

Y por supuesto a mi familia, lo más importante en mi vida, porque sin ellos no hubiera llegado nunca hasta aquí. A mis padres, porque lo habéis dado todo por nosotras, porque siempre estuviéramos bien y no nos faltara de nada, y gracias a vosotros somos lo que somos. Gracias por creer en mí, por apoyarme y animarme día a día a ser mejor y a superarme a mi misma en todos los aspectos de la vida. Sin vuestra ayuda y dedicación no hubiera sido nunca lo que soy ahora. A mi hermana, por estar siempre a mi lado cuando la he necesitado a pesar de nuestras diferencias, porque en los momentos difíciles siempre estás ahí.

A Sergio, porque eres mi otra mitad, la que me complementa y me equilibra. Gracias por estar a mi lado en todo momento, por escucharme, aconsejarme y preocuparte siempre por mí. Haces que todo sea siempre más fácil, me conoces y me entiendes mejor que nadie, y consigues que cada día que paso contigo quiera muchos más días así.

Y sobre todo a Noa, mi gordita, porque aunque ya no estás aquí sé que sigues conmigo. Has sido lo mejor que me ha pasado nunca y cuando te fuiste te llevaste un pedacito de mi corazón contigo.

ÍNDICE

ÍNDICE	3
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	
1. El sistema inmune	13
1.1 Componentes celulares del sistema inmune.	13
1.2 La inmunidad innata.	13
1.3 La inmunidad adquirida.	14
1.4 Los órganos linfoides.	15
1.4.1 Órganos linfoides primarios.	15
1.4.2 Órganos linfoides secundarios.	15
2. Las células dendríticas	18
2.1 Tipos de células dendríticas.	18
2.1.1 Células dendríticas convencionales.	19
2.1.2 Células dendríticas plasmacitoides.	20
2.1.3 Células dendríticas derivadas de monocitos o inflamatorias.	21
2.2 Ciclo biológico de las células dendríticas.	21
3. La sinapsis inmunológica	22
3.1 Estructura de la sinapsis inmunológica en el linfocito T.	23
3.1.1 Proteínas de superficie en la región SI-T.	23
3.1.2 Proteínas del citoesqueleto en la región SI-T.	25
3.1.3 Moléculas de señalización en la región SI-T.	25
3.2 Estructura de la sinapsis inmunológica en la célula dendrítica.	27
3.2.1 Proteínas de superficie en la región SI-CD.	27
3.2.2 Proteínas del citoesqueleto en la región SI-CD.	27
3.2.3 Moléculas de señalización en la región SI-CD.	28
3.3 Dinámica de la sinapsis inmunológica.	28
4. La autofagia	
4.1. Características generales y tipos de autofagia.	30
4.2. Macroautofagia.	31
4.2.1. Fases de la autofagia y efectores moleculares.	32

4.3. Procesos que regulan la autofagia.	35
4.3.1. Ayuno de nutrientes y factores de crecimiento.	35
4.3.2. Señales del sistema inmune.	36
4.3.3. Daño mitocondrial.	36
4.3.4. Estrés oxidativo.	37
5. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo.	
5.1. Especies reactivas de oxígeno.	39
5.2. Fuentes de especies reactivas de oxígeno en la célula.	39
5.2.1. La mitocondria como fuente generadora de ROS.	39
5.2.2. Otras fuentes generadoras de ROS.	41
5.3. Estrés oxidativo y agentes detoxificantes de ROS.	41
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Reactivos generales.	49
2. Animales de experimentación.	49
2.1. Extracción del DNA genómico de colas de ratones adultos.	51
2.2. Fenotipaje de ratones GFP-LC3 y genotipaje de ratones Atg5 KO.	51
3. Cultivos celulares.	
3.1. Células dendríticas obtenidas a partir de bazo de ratón.	51
3.2. Linfocitos CD4 ⁺ obtenidos a partir de ganglios y bazo de ratón.	52
4. Formación de sinapsis inmunológicas.	52
5. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).	52
6. Análisis del potencial de membrana mitocondrial.	53
7. Ensayos de apoptosis.	53
8. Ensayos de proliferación de linfocitos T.	54
9. Western Blot.	54
10. Citometría de flujo.	55
11. Inmunocitoquímica.	55
12. Microscopía de fluorescencia y confocal.	56
13. Microscopía electrónica de transmisión.	56

14. Análisis <i>in vivo</i> de la producción de ROS.	56
15. Análisis estadístico.	57

RESULTADOS

1. La formación de la sinapsis inmunológica induce la producción de ROS en la célula dendrítica.	61
2. La mitocondria es la principal fuente de ROS en la célula dendrítica durante la sinapsis inmunológica.	64
3. La sinapsis inmunológica induce autofagia independiente de mTORC1 en la célula dendrítica.	69
4. La autofagia inducida por la sinapsis inmunológica regula la generación de ROS mitocondriales en la célula dendrítica.	74
5. Los ROS generados en la mitocondria durante la sinapsis inmunológica inducen la activación de la señalización a partir de TCR/CD28 en los linfocitos T.	81

DISCUSIÓN	89
------------------	-----------

CONCLUSIONES	101
---------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	105
---------------------	------------

ABREVIATURAS	121
---------------------	------------

PUBLICACIONES	127
----------------------	------------

SUMMARY

Dendritic cells (DCs) are the most important antigen presenting cells and they are able to initiate the immunological response through the activation of naïve T cells. The activation of these T cells takes place in the lymph nodes and requires tight contact with antigen presenting DCs. *In vivo* and *in vitro* studies indicate that during these interactions a specialized cell-cell junction called immunological synapse (IS) forms at the region of contact between DCs and T cells. The IS includes membrane and cytoplasmic components at the T cell and DC side, regions called IS (T cell) and IS (DC), respectively. Most studies on the IS have focused on the structure and functions of the IS (T cell) and there is sparse information available on the IS (DC) and its role in T cell activation.

In this work we show that antigen-specific IS formation between DCs and CD4 T cells leads to a rapid upsurge of mitochondrial ROS in DCs *in vitro* and *in vivo*. As indicated before for T cells, in the DCs forming IS the mitochondria also redistribute to the vicinity of the IS region, suggesting that clustering of mitochondria in this region and the production of ROS are coordinated. In addition, we show that the increase in ROS production after IS formation triggers mitochondrial depolarization in DCs.

We also demonstrate that upon IS formation in DCs autophagy and mitophagy, two well-established mechanisms of quality control involved in the removal of damage proteins and organelles like mitochondria, are induced. Indeed, the presence of autophagosomes and signaling molecules controlling autophagy and mitophagy at the vicinity of the IS (DC) indicates that these processes are active at this region. Our data also confirm that IS-induced autophagy in DCs is not caused by ROS, as shown in other settings, because it is not affected by general inhibition of ROS production by treating the DCs with anti-oxidant agents or the selective inhibition of mitochondrial ROS by treatment with MitoQ.

All these results were confirmed using Atg5^{-/-} DCs. We have observed an increase in mitochondrial number in these cells, suggesting defect in mitophagy. Atg5^{-/-} DCs also show an increase in ROS production, whose generation is blocked by treatment with MitoQ. Most importantly, IS formation is not able to up-regulate ROS production in these cells, indicating that autophagy/mitophagy in DCs is necessary to allow IS-dependent control of ROS up-regulation.

Finally we investigated the role of these mitochondrial ROS generated in DCs, and we show that up-regulation of ROS in DCs upon IS formation controls early signaling events during T cell activation. All these data together uncover a novel mechanism whereby the IS (DC) may modulate T cells activation and proliferation.

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune constituye un sistema de defensa multifuncional que protege a los animales de la invasión de patógenos provenientes del entorno, incluyendo a virus, bacterias, hongos y parásitos; y también frente a alteraciones en las propias células del organismo que pudieran dar lugar a enfermedades como el cáncer (Fearon and Locksley 1996).

Clásicamente se ha establecido que el sistema inmune participa en dos tipos de respuesta de defensa, la denominada inmunidad innata (o natural) y la inmunidad adquirida (o adaptativa). La respuesta inmune innata representa la primera línea de defensa, efectiva y rápida contra agentes infecciosos y agresiones físicas. La respuesta inmune adaptativa, que es típica de organismos superiores, es mucho más específica y sostenida, actuando frente a los patógenos que eluden la respuesta inmune innata (Fearon and Locksley 1996).

1.1 Componentes celulares del sistema inmune

Las células que componen el sistema inmune se denominan genéricamente leucocitos o células blancas. Los leucocitos se subdividen en dos categorías principales: los linfocitos y los fagocitos, incluyendo estos últimos granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, macrófagos y células dendríticas (CDs).

Los linfocitos se subdividen a su vez en tres tipos: los linfocitos T, los linfocitos B y las células NK (*Natural Killer*). Los linfocitos T también se encuentran subdivididos en dos grupos, los linfocitos T CD4⁺ o Th (*T helper* o cooperador), y los linfocitos T CD8⁺ o linfocitos T citotóxicos.

Todos estos componentes celulares se originan en la médula ósea y se encuentran circulando por el torrente circulatorio, en los órganos linfoides o dispersos en otras localizaciones del cuerpo.

1.2 La inmunidad innata

La respuesta inmune innata está constituida mayoritariamente por mecanismos que no son específicos de un patógeno determinado, sino que responden de manera relativamente poco selectiva frente a estos organismos. Abarcan componentes celulares y moleculares que reconocen productos del metabolismo microbiano conservados entre diversos microorganismos, a los que se denomina “patrones moleculares asociados a patógenos”, como es el caso del lipopolisacárido bacteriano (LPS), carbohidratos, ARN vírico de doble cadena, etc. (Medzhitov 2001).

En la inmunidad innata participan las barreras físicas y químicas del organismo como la piel o el bajo pH del estómago, aparte de los diferentes tipos celulares como linfocitos NK, células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos, CDs y diversos componentes antimicrobianos usados por el huésped como las proteínas del complemento.

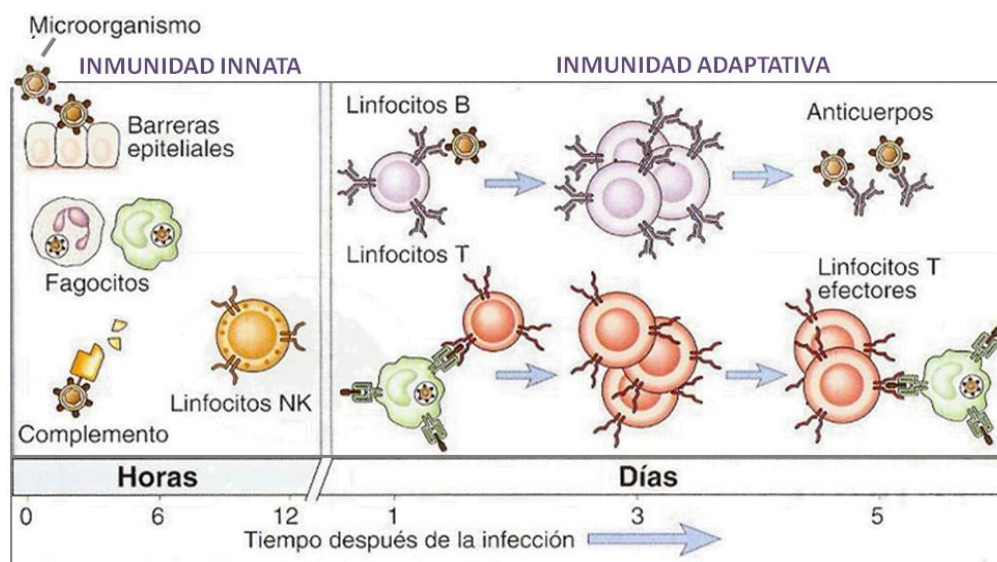


Figura 1. Respuesta inmune ante un patógeno. Los mecanismos de la inmunidad innata constituyen la primera defensa ante una infección, mientras que las respuestas adaptativas se desencadenan más tardíamente. La cinética de ambas respuestas aquí mostrada es aproximada y depende del tipo de infección.

1.3 La inmunidad adquirida

El sistema inmune adaptativo supone una respuesta más lenta y específica frente a los distintos patógenos. A diferencia del sistema inmune innato que responde a estructuras moleculares generales compartidas por distintos grupos de patógenos, el sistema inmune adaptativo responde a antígenos específicos de los agentes patogénicos. Esta respuesta, aparte de proporcionar una mayor especificidad, también desarrolla una memoria inmunológica, lo que implica que cuando un determinado agente frente al que se expuso el organismo previamente vuelve a atacarlo, la respuesta es mucho más rápida (Banchereau, Briere et al. 2000).

La inmunidad adquirida está mediada por los linfocitos T y los linfocitos B. Para que se inicie esta respuesta inmune frente a los diferentes antígenos, se requiere primero el reconocimiento de los mismos por parte de aquellos linfocitos que poseen los receptores específicos, y tras ello la activación de esos linfocitos (Litman, Rast et al. 2010). Las células encargadas de la presentación antigénica son las denominadas células presentadoras de antígenos (CPAs). Estas células, entre las que se encuentran las células dendríticas (CDs), reconocen e incorporan patógenos, los cuales procesan para presentarlos posteriormente a los linfocitos (Trombetta and Mellman 2005).

1.4 Los órganos linfoides

Los órganos linfoides se dividen en dos grandes grupos en base a sus características funcionales: primarios y secundarios. En los órganos linfoides primarios, médula ósea y timo, tiene lugar la formación de células inmunocompetentes, mientras que en los órganos linfoides secundarios, ganglios linfáticos, bazo y tejidos linfoides asociados a mucosas, se lleva a cabo la respuesta inmunológica frente a los diferentes antígenos.

1.4.1 Órganos linfoides primarios.

La médula ósea se caracteriza por ser simultáneamente un órgano linfoide primario, por su función hematopoyética, y secundario, por ser el lugar donde tiene lugar la diferenciación final de linfocitos B a linfocitos B plasmáticos. En este órgano se generan las células troncales hematopoyéticas o células madre, origen de todas las células sanguíneas (Mercier, Ragu et al. 2012).

El timo es el órgano donde tiene lugar la diferenciación de los linfocitos T, proceso necesario para adquirir la capacidad de distinguir lo propio (“*self*”) y lo no-propio (“*non-self*”) (Rodewald 2008; Gordon and Manley 2011; Alexandropoulos and Danzl 2012).

1.4.2 Órganos linfoides secundarios

El bazo y los ganglios linfáticos son los órganos linfoides secundarios con un elevado grado de organización. Estos órganos se encuentran localizados de forma estratégica para poder realizar su función de manera eficiente. La estructura de los distintos órganos linfoides está formada por agregados de células linfoides y no linfoides, rodeados por una red de capilares de drenaje. Sin embargo, a diferencia de los tejidos linfoides asociados a mucosas, en el bazo y los ganglios linfáticos existen regiones precisas para la activación de linfocitos B y T, y son órganos rodeados por una cápsula fibrosa.

El bazo constituye uno de los principales filtros de sangre del cuerpo, por lo que se erige como un órgano necesario para la captura de antígenos, permitiendo a las células del sistema inmune la defensa contra patógenos presentes en la sangre. El bazo está rodeado de una cápsula fibrosa desde la que se desarrollan trabéculas hacia el interior del tejido, proporcionando soporte para el órgano y su vascularización. Los vasos sanguíneos entran en el bazo a través del hilio y se ramifican en arteriolas centrales, las cuales se encuentran rodeadas por compartimentos linfoides organizados que reciben el nombre de pulpa blanca.

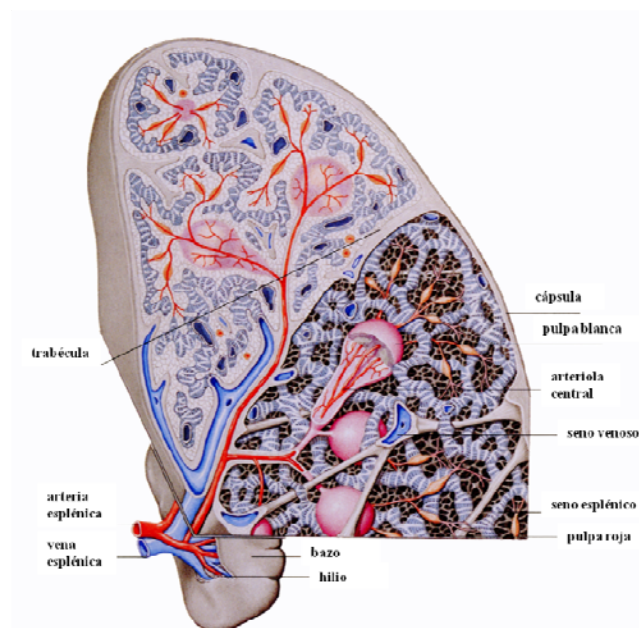


Figura 2. Representación esquemática de la organización del bazo. El bazo presenta una cápsula de colágeno y fibrinógeno, de la cual surgen las trabéculas. La mayor parte del bazo está compuesta por una formación de sinusoides y senos vasculares rellenos de sangre (pulpa roja), y una formación de arterias ramificadas asociadas a agregados de tejidos linfoides (pulpa blanca).

Estas ramificaciones de las arteriolas centrales terminan en la zona marginal, encargada de formar la interfase entre la pulpa roja y la pulpa blanca del bazo. En la pulpa roja tiene lugar el filtrado de la sangre gracias a la especial disposición de los vasos sanguíneos y de las células reticulares, y el reciclado de hierro, debido especialmente a los macrófagos aquí localizados (Mebius and Kraal 2005). En los ratones, la pulpa esplénica blanca consiste en zonas de linfocitos T rodeando una arteriola central, folículos de linfocitos B asociados y la zona marginal que los rodea (Cesta 2006).

Las zonas de linfocitos T en el bazo contienen linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, así como diferentes subtipos de CDs. Estas células se sostienen gracias a una red de células estromales denominadas células reticulares fibroblásticas. En los folículos de linfocitos B, éstos se encuentran sostenidos por una red de CDs foliculares, y por una red más difusa de células estromales. La zona marginal contiene macrófagos que expresan CD169 (receptor para la proteína sialoadhesina), macrófagos de la zona marginal, subtipos de CDs y linfocitos B de la zona marginal, todos ellos englobados en una densa red de células del estroma (Mebius and Kraal 2005; Cinamon, Zachariah et al. 2008).

Los ganglios linfáticos se encuentran distribuidos por el cuerpo y presentan una estructura interna característica que permite el reconocimiento y transporte de los antígenos para la generación de la respuesta inmune. Éstos también son órganos linfoides encapsulados, encargados de recibir el filtrado de fluido extracelular (linfa) a través de una serie de vasos linfáticos, que drenan los tejidos y órganos del cuerpo. Bajo la cápsula del ganglio linfático se encuentra el seno subcapsular (SCS), a través del cual

los vasos linfáticos aferentes descargan tanto antígenos y microorganismos como células (linfocitos y células presentadoras de antígeno) desde los tejidos. Los macrófagos se alinean en el SCS y fagocitan antígenos y partículas que entran en el ganglio a través de la linfa, de manera similar a lo que hacen los macrófagos en la zona marginal del bazo (Drinker, Field et al. 1934; Drayton, Liao et al. 2006). Los linfocitos entran desde la sangre a través de vénulas endoteliales poscapilares especializadas (HEV, *high endothelial venules*), que se suelen organizar en regiones entre las zonas de linfocitos T y linfocitos B (Katakai, Hara et al. 2004; Vondenhoff, Kraal et al. 2007).

De manera similar a lo que sucede en el bazo, las zonas de linfocitos T contienen linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ y distintos subtipos de CDs, sostenidas en una red de fibras reticulares. Por otro lado, los folículos de linfocitos B contienen células foliculares dendríticas y un complejo sistema de células estromales en la periferia, que bordea las zonas de linfocitos T y el SCS. Las células estromales que se encuentran entre los folículos de linfocitos B y el SCS tienen propiedades únicas que las distinguen como células reticulares marginales, de forma similar a lo que ocurre en el bazo (Katakai, Suto et al. 2008).

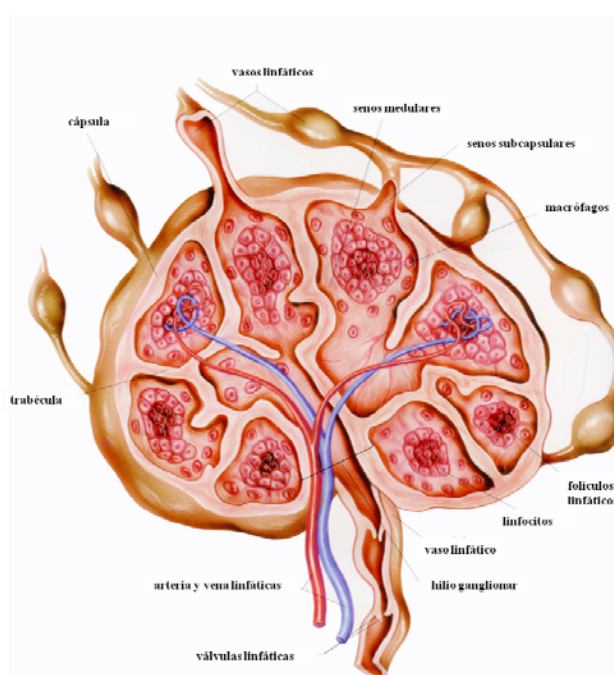


Figura 3. Representación esquemática de la organización del ganglio linfático. El ganglio linfático presenta un hilio por el que entran los vasos sanguíneos y salen los vasos linfáticos eferentes. Los vasos linfáticos aferentes penetran por la superficie convexa de la glándula y drenan por el sistema de senos subcapsular y medular.

En el proceso de defensa frente a las infecciones los órganos linfoides secundarios cumplen tres funciones: (1) previenen la diseminación de patógenos mediante su captura por macrófagos estratégicamente localizados (Ochsenbein, Fehr et al. 1999; Junt, Moseman et al. 2007), y también mediante la producción de mediadores

inmunes como los interferones de tipo I (IFN-1) (Cervantes-Barragan, Züst et al. 2007); (2) ponen en contacto las CPAs con linfocitos específicos de patógenos para inducir una eficiente respuesta inmune (Stoll, Delon et al. 2002; Mempel, Henrickson et al. 2004) y (3) proporcionan los factores necesarios para la supervivencia y diferenciación de los linfocitos (Schluns and Lefrancois 2003)

2. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las CDs fueron descritas por primera vez por Paul Langerhans, quién las describió en la piel hace más de un siglo como “células con proyecciones en su superficie similares a las dendritas de las neuronas”. Estas células de la piel se denominaron inicialmente células de Langerhans (LC, *Langerhans cells*) y debido a su morfología semejante a las neuronas, se consideró que pertenecían al sistema nervioso. En 1973, Steinman y Cohn describieron una población de células nuevas con propiedades similares en los órganos linfoides (Steinman and Cohn 1973). Al mismo tiempo, dos grupos independientes describieron la expresión del antígeno “Ia” en LC, así como su capacidad para presentar antígenos (Klareskog, Tjernlund et al. 1977; Rowden, Lewis et al. 1977).

Las CDs constituyen una población de células que comprende tan solo el 1% de las células presentes en los órganos linfoides periféricos. Poseen propiedades que las convierten en células idóneas para la captura y presentación de antígenos, y posterior polarización de linfocitos T (Banchereau and Steinman 1998). En primer lugar actúan como centinelas conformando una extensa red entrelazada bajo las superficies epiteliales, sitios clave de entrada de patógenos al organismo, y además poseen diferentes receptores endocíticos que les permiten detectar la presencia de patógenos y emitir la señal de alerta al sistema inmune (Steinman and Banchereau 2007). En segundo lugar, aunque diferentes tipos celulares expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (MHC, *major histocompatibility complex I y II*) necesarias para la presentación de antígenos, las CDs activan eficientemente a los linfocitos T *naive* (Jung, Woo et al. 2002; Zammit, Cauley et al. 2005; Belz, Wilson et al. 2006). Y en tercer lugar, las CDs poseen la maquinaria especializada para el procesamiento y presentación eficiente de los mismos, así como niveles elevados de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T. (Banchereau and Steinman 1998; Banchereau, Briere et al. 2000). Por todo ello, entre las CPAs, las CDs representan un sistema único como sensores de patógenos invasores.

2.1 Tipos de células dendríticas.

Las CDs se definieron originalmente en base a sus características morfológicas (Steinman and Cohn 1973), y posteriormente por la alta expresión de MHC II y por su capacidad para presentar el antígeno a los linfocitos T. Sin embargo, el uso de estos

criterios relativamente simples ha llevado a una gran confusión a la hora de diferenciar macrófagos y CDs. Parte de esta confusión se debe al uso de marcadores de superficie no completamente específicos como es el caso de CD11c, que aunque es un marcador típico de las CDs también se expresa en otras poblaciones leucocitarias. Recientemente se ha encontrado el factor de transcripción Zbtb46 que parece ser exclusivo de las CDs (Meredith, Liu et al. 2012).

Las CDs por tanto, constituyen una población de células heterogénea, que son fenotípicamente descritas en base a diversos marcadores de superficie y por características funcionales propias. Se pueden dividir en tres grupos: CDs convencionales, CDs plasmacitoides y CDs derivadas de monocitos o inflamatorias. En esta Tesis Doctoral, tan sólo tratamos las CDs convencionales.

2.1.1 Células dendríticas convencionales.

Las CDs convencionales están especializadas en el procesamiento y presentación antigénica. Se pueden subdividir en dos grupos principales en base a su localización en los tejidos y sus vías de migración en el organismo: CDs migratorias, localizadas en los tejidos periféricos; y CDs residentes en tejidos linfoides (Belz and Nutt 2012).

A) Células dendríticas migratorias.

Las CDs migratorias derivan de células precursoras que se diferencian en los tejidos, donde actúan como centinelas frente a antígenos. Desde los tejidos migran hacia los ganglios linfáticos locales a través de los vasos linfáticos aferentes, proceso que se ve acelerado en respuesta a señales de peligro como aquellas que aparecen durante una infección por patógenos. Estas CDs se pueden dividir en CD11b⁺ (conocidas también como dérmicas o intersticiales), y CD11b⁻ (Belz and Nutt 2012). Como se indicaba más arriba, recientemente se ha descrito un nuevo marcador específico de estas CDs convencionales (tanto migratorias como residentes), denominado Zbtb46. Este factor de transcripción pertenece a la familia BTB (POZ), el cual se expresa tanto en CDs humanas como murinas (Meredith, Liu et al. 2012; Satpathy, Kc et al. 2012).

Las células de Langerhans son el prototipo de CD migratoria, encontrándose localizadas en el epitelio escamoso de la piel, así como en el tejido del intestino, tracto respiratorio y tracto reproductivo.

B) Células dendríticas residentes en los tejidos linfoides.

Al contrario que las CDs migratorias, estas células residen en los tejidos linfoides, como ganglios linfáticos, bazo y timo, y no migran hacia los órganos linfoides desde los vasos linfáticos, sino que capturan y presentan antígenos en el propio órgano linfoide. Las CDs residentes engloban

aproximadamente la mitad de las CDs que se encuentran en los ganglios linfáticos (Henri, Vremec et al. 2001; Wilson, El-Sukkari et al. 2003) y constituyen la mayoría de las CDs que se hallan en el bazo (Vremec, Pooley et al. 2000) y en el timo (Ardavin 1997). Las CDs residentes en los ganglios linfáticos y el bazo de ratones se caracterizan por la expresión del marcador CD11c, y se pueden subdividir, basándose en la expresión diferencial del co-receptor de linfocitos T CD8, en células dendríticas CD8⁺ y células dendríticas CD8⁻ (Vremec, Pooley et al. 2000; Reizis 2012). Ambas poblaciones de células difieren en sus funciones inmunes incluyendo la producción de citoquinas (Reis e Sousa, Hieny et al. 1997; Hochrein and O'Keeffe 2008) y la presentación de antígenos en las moléculas MHC (Pooley, Heath et al. 2001; Heath, Belz et al. 2004). Las CDs de tipo CD8⁻ pueden dividirse a su vez en CDs de tipo CD4⁺CD8⁻ y CD4⁻CD8⁺ (Vremec, Pooley et al. 2000; Belz and Nutt 2012). A diferencia de las CDs migratorias, presentan un fenotipo inmaduro y son activas en la captación y procesamiento de antígenos.

2.1.2 Células dendríticas plasmacitoides.

Las CDs plasmacitoides se describieron originalmente como células dotadas de capacidad para liberar rápidamente IFN- α durante las infecciones víricas (Grouard, Rissoan et al. 1997; Belz and Nutt 2012), y presentan una vida media más larga que las CDs convencionales.

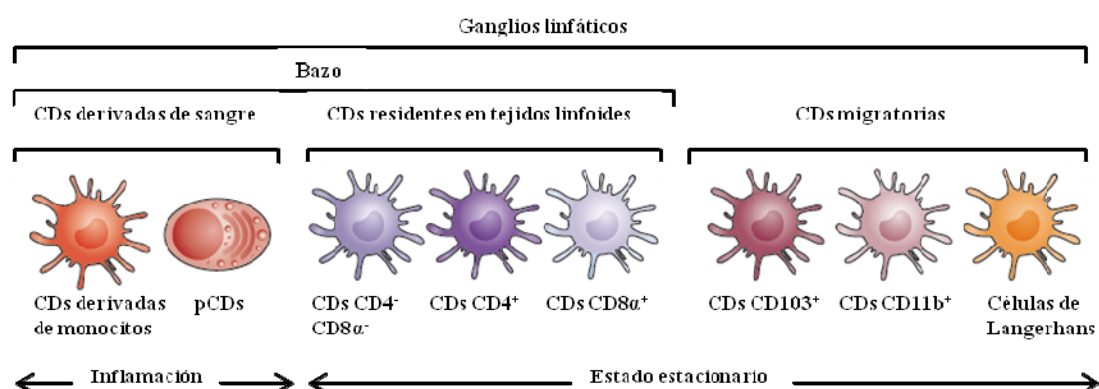


Figura 4. Organización de las CDs. Las CDs se agrupan en función de su localización en los órganos linfoides secundarios. Las CDs derivadas de monocitos se reclutan rápidamente a los puntos de inflamación, mientras que otros subtipos de CDs se encuentran localizadas en los tejidos, donde actúan como centinelas de las infecciones. Adaptado de (Belz and Nutt 2012).

2.1.3 Células dendríticas derivadas de monocitos o inflamatorias.

Bajo condiciones de inflamación, los monocitos circulantes en sangre pueden ser movilizados rápidamente y diferenciarse en CDs (Naik, Metcalf et al. 2006; Leon, Lopez-Bravo et al. 2007; Kool, Soullie et al. 2008). En respuesta a factores de crecimiento como el factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF) *in vitro*, ligandos del receptor TLR4 o la exposición a bacterias *in vivo*, estos monocitos se diferencian a CDs. Al igual que las CDs convencionales, estas células expresan CD11c, MHC de clase II, etc. (Cheong, Matos et al. 2010). Además, adquieren una potente capacidad de presentación antigénica, incluyendo la capacidad de realizar una crospresentación de antígenos (den Haan and Bevan 2002; McDonnell, Prosser et al. 2010).

2.2 Ciclo biológico de las células dendríticas.

Las CDs derivan de progenitores derivados de células madre hematopoyéticas. Tras sucesivas etapas de diferenciación las pre-CDs pasan al torrente sanguíneo, desde donde se extravasan a los tejidos en un estado de diferenciación denominado de CDs inmaduras (Geissmann, Manz et al. 2010). Estas CDs inmaduras se encuentran equipadas con la maquinaria necesaria para la captura y procesamiento de antígenos extraños (Banchereau and Steinman 1998; Bell, Young et al. 1999), los cuales internalizan mediante macropinocitosis, fagocitosis o endocitosis mediada por receptores de manosa (Sallusto, Cella et al. 1995). Sin embargo, en este estado las CDs presentan una capacidad relativamente baja para estimular los linfocitos T naive debido a sus bajos niveles de expresión de moléculas MHC de clase I y II, y de moléculas co-estimuladoras y de adhesión, que median la interacción con los linfocitos.

Tras recibir el estímulo quimiotáctico y capturar los antígenos, las CDs salen del tejido para dirigirse al área de linfocitos T en los ganglios linfáticos. Para que se produzca eficazmente la salida de los tejidos disminuye la expresión de los receptores de quimioquinas inflamatorias (presentes en los tejidos inflamados) y aumenta la expresión del receptor de quimioquinas CCR7 que dirige las CDs hacia los vasos linfáticos, a través de los cuales llegan a la región de las células T en el interior de los ganglios linfáticos (Banchereau and Steinman 1998).

En esta última región interaccionan y presentan los antígenos capturados en las zonas de inflamación a los linfocitos T. De esta manera, las células T que presenten el TCR específico para la carga antigénica de las CDs maduras, experimentan un proceso de activación y proliferación (Mempel, Henrickson et al. 2004). Las CDs poseen además, una capacidad única para penetrar en los pequeños vasos linfáticos de los tejidos periféricos y migrar hacia los ganglios linfáticos locales.

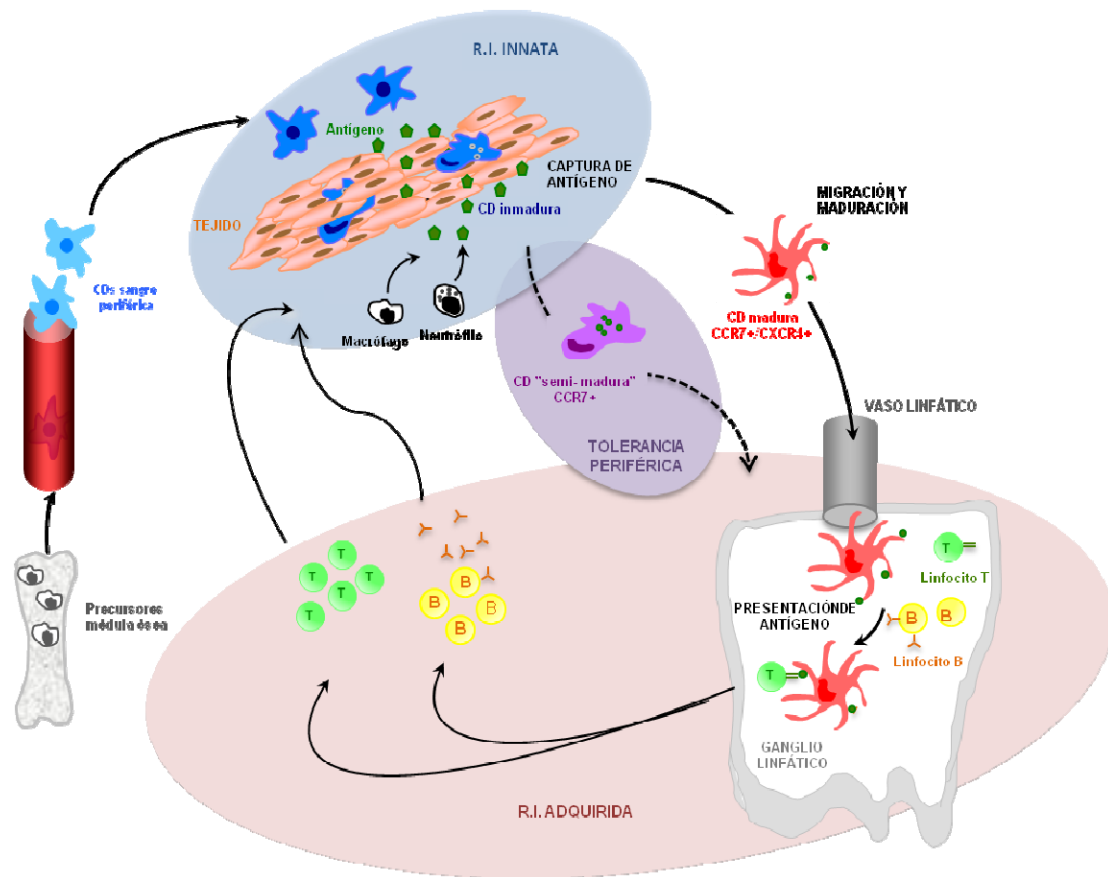


Figura 6. Ciclo biológico de las CDs. Los precusores de médula ósea pasan a la sangre donde se diferencian a CDs de sangre periférica, pudiendo diferenciarse también tras migrar a los tejidos. En los tejidos periféricos residen como CDs inmaduras, que capturan y procesan antígenos. Tras su exposición a las “señales de peligro”, comienzan a madurar y migran hacia los ganglios linfáticos, en los cuales, como CDs maduras, presentan los antígenos a los linfocitos T. Estos linfocitos T sufren un proceso de activación y proliferación y migran a los tejidos donde las CDs captaron los antígenos para eliminar la infección.

3. LA SINAPSIS INMUNOLÓGICA

El término “sinapsis inmunológica” fue empleado por primera vez por Paul y Seder (Paul and Seder 1994) para describir la zona de interacción entre los linfocitos T y los linfocitos B, debido a su parecido con la sinapsis formada entre dos neuronas a través de la cual viajan los neurotransmisores secretados por las mismas. Posteriormente se definió la sinapsis inmunológica (SI) como la región donde se produce una “unión estable entre un linfocito T y una célula presentadora de antígenos” (Dustin 2009; Fooksman, Vardhana et al. 2010).

Se pueden diferenciar distintos tipos de sinapsis en función de las células presentadoras de antígenos que se unen a los linfocitos T, pudiendo formarse sinapsis con CDs, linfocitos B, células NK o macrófagos. Todas estas células presentadoras de antígenos expresan en diferente grado moléculas de superficie que se encuentran

implicadas en la unión con el linfocito T y su posterior activación, así como también difieren en la estructura y función del citoesqueleto (Friedl, den Boer et al. 2005).

La mayoría de los estudios realizados sobre la SI se han centrado en el lado del linfocito T, por lo que es de dicha región de la que se tiene más información, siendo esta una de las razones por la cual el concepto de SI se ha usado habitualmente como sinónimo de SI-linfocito T (SI-T).

En el presente trabajo nos hemos centrado fundamentalmente en el estudio de la sinapsis de la CD (SI-CD).

3.1 Estructura de la sinapsis inmunológica en el linfocito T

En la región de la sinapsis inmunológica en el linfocito T (SI-T) se pueden encontrar tres grupos de moléculas: proteínas de membrana, entre las que se encuentran moléculas de adhesión que permiten la unión con la CD, moléculas señalizadoras y proteínas del citoesqueleto, que mantienen la estructura y regulan las funciones de la SI del linfocito T.

3.1.1 Proteínas de superficie en la región SI-T.

Entre las proteínas de superficie se encuentran receptores y ligandos que permiten la adhesión entre el linfocito y la CD, siendo fundamentales para la formación y organización inicial de la sinapsis a nivel del linfocito T. En la mayoría de los casos estas moléculas transmiten señales intracelulares que, directa o indirectamente, controlan la organización y la función de la región (Dustin 2009).

Moléculas importantes en este grupo son las integrinas VLA4 ($\alpha_4\beta_1$) y LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$), capaces de inducir una gran variedad de señales intracelulares implicadas no solo en la regulación de la adhesión a la CD, sino también en otras funciones del linfocito T.

El receptor de la célula T (TCR) es un componente central de las proteínas de superficie en esta región, desempeñando un papel clave en la activación del linfocito (O'Shea, Johnston et al. 2001). Señales generadas por el TCR desencadenan la activación de la integrina LFA-1, el reclutamiento de su ligando ICAM-1 en la CD y eventualmente, la formación de la SI. Moléculas coestimuladoras como CD2 y CD28 son necesarias también para la activación del linfocito T. La deficiencia de alguna de ellas afecta moderadamente a la formación de la sinapsis, sin embargo, la falta de ambas de manera simultánea provoca una reducción de casi el 60% en el número de sinapsis formadas, sugiriendo así que estos receptores cooperan en la inducción de la formación de la SI (Green, Karpitskiy et al. 2000). Se ha visto también que la estimulación del TCR y de CD28 puede desencadenar señales que resultan en la polimerización de la

actina (O'Shea, Johnston et al. 2001), lo que indica que ambas moléculas podrían contribuir a la formación de la SI-T regulando su estructura.

Otras proteínas importantes que se han visto localizada en esta región son el receptor de interferón γ (IF γ -R (Maldonado, Soriano et al. 2009), y receptores de quimioquinas como CCR5 y CXCR4 (Contento, Molon et al. 2008).

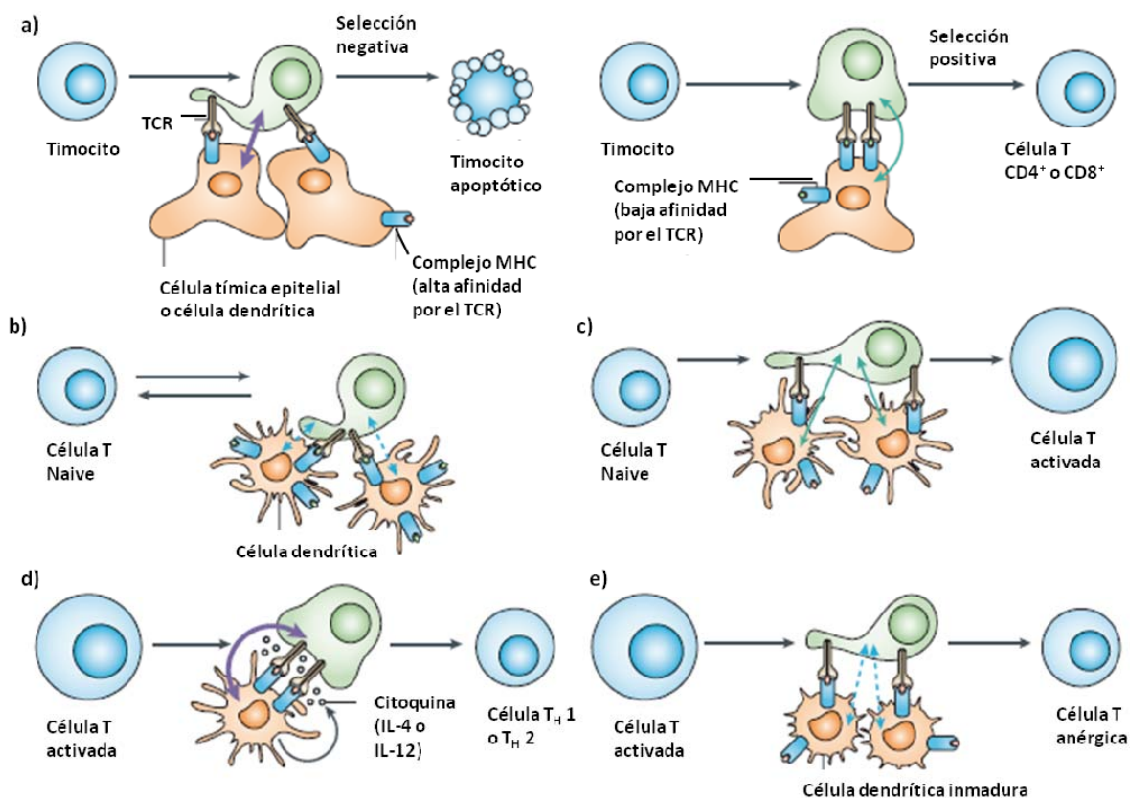


Figura 7. Diferentes interacciones entre CDs y linfocitos T. Interacciones entre células T y CDs en el timo (a) y en órganos linfoides secundarios (b-e) desencadenan el desarrollo, mantenimiento, activación y adquisición de la función colaboradora o efectora de los linfocitos T. Los diferentes resultados dependen del tipo de contacto y de la intensidad de la señal. **a)** Afinidades diferentes entre el TCR y el MHC determinan que se produzca una selección negativa o positiva del linfocito. **b)** Contactos sucesivos en ausencia de péptido agonista favorecen la homeostasis de los linfocitos T. **c)** Contactos sucesivos con los complejos MHC unidos a péptidos agonistas permiten la activación del linfocito. **d)** Los contactos estables de los linfocitos con las CDs permiten mantener la liberación de citoquinas desde la CD y la maduración de los linfocitos T. **e)** Contactos sucesivos que no desencadenan una unión estable están implicados en la inducción de la tolerancia. Adaptado de (Friedl, den Boer et al. 2005).

Una característica importante de la SI-T es el alto grado de organización de las moléculas de superficie (Saito and Yokosuka 2006; Cemerski, Das et al. 2007). Se produce una segregación molecular que origina un patrón conocido como “ojo de toro”, el cual presenta una zona central conocida como clúster central supramolecular de activación (cSMAC), donde se encuentra situado el TCR y moléculas coestimuladoras

como CD4, CD8, CD28 y CD2. Alrededor de este cSMAC se dispone un anillo conocido como clúster periférico supramolecular de activación (pSMAC), compuesto principalmente por moléculas de LFA1 aunque también hay proteínas como CD43 y CD45 (Friedl, den Boer et al. 2005; Dustin, Tseng et al. 2006).

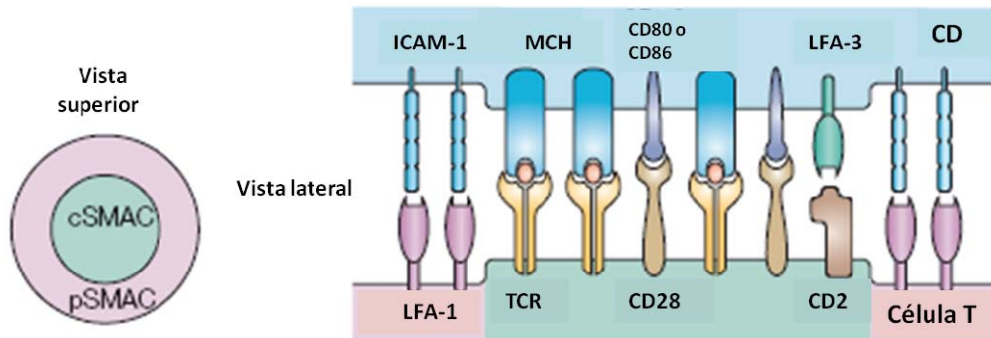


Figura 8. Organización de las proteínas de superficie del linfocito T en la zona de contacto con la CD. La zona de interacción presenta dos regiones diferenciadas, una región central conocida como cSMAC (clúster central de activación supramolecular) donde se encuentra localizado el TCR, y una región periférica denominada pSMAC (clúster periférico de activación supramolecular). Adaptado de (Friedl, den Boer et al. 2005).

3.1.2 Proteínas del citoesqueleto en la región SI-T.

Las proteínas citoesqueléticas, aparte de su papel estructural, contribuyen a controlar la señalización en la región SI-T al proporcionar un soporte al que se pueden unir diferentes moléculas (Dustin 2009). Entre estas moléculas se encuentra la actina, la tubulina y proteínas asociadas al citoesqueleto, que son importantes para mantener la organización de la región SI-T (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid 2004).

Esta región, es un sitio activo de polimerización de la actina (Billadeau, Nolz et al. 2007), y se ha visto que la alteración en la organización de la actina provoca que la formación de la sinapsis se vea afectada (Eibert, Lee et al. 2004). Además durante la formación de la sinapsis el centro organizador de microtúbulos (MTOC) y el aparato de Golgi quedan orientados hacia la región SI-T, lo que se piensa que es necesario para la liberación de moléculas señalizadoras a dicha zona (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid 2004).

3.1.3 Moléculas de señalización en la región SI-T.

La acumulación de moléculas de señalización en esta zona sugiere la existencia de intensos procesos de señalización que están implicados en la regulación tanto de la estructura como de la función de la región SI-T.

Entre estas moléculas se encuentran una serie de quinasas, incluyendo tirosina quinasas, como Lck, ZAP-70 y Fyn (Dustin 2009). Estas quinasas son importantes para la transmisión de señales desde el TCR, ya que este receptor carece de actividad enzimática. El inicio de la señalización desde el TCR tiene lugar por medio de la quinasa Lck que fosforila residuos del complejo TCR/CD3. Posteriormente la quinasa ZAP-70 se asocia al complejo TCR/CD3, lo cual promueve la fosforilación de nuevas moléculas como el adaptador LAT. Una vez que LAT es fosforilado recluta una variedad de enzimas que lo conectan con pequeñas GTPasas Rac, activándose también la quinasa PKC θ (Zhang, Triple et al. 2000).

PKC θ juega un papel muy importante en la activación del linfocito T, pues regula la activación de diversos factores de transcripción como es el caso de NF κ B, AP-1 y NFAT, controlando la supervivencia, activación y diferenciación del linfocito T (Kaminski, Kiessling et al. 2007; Wang, Chuang et al. 2012)

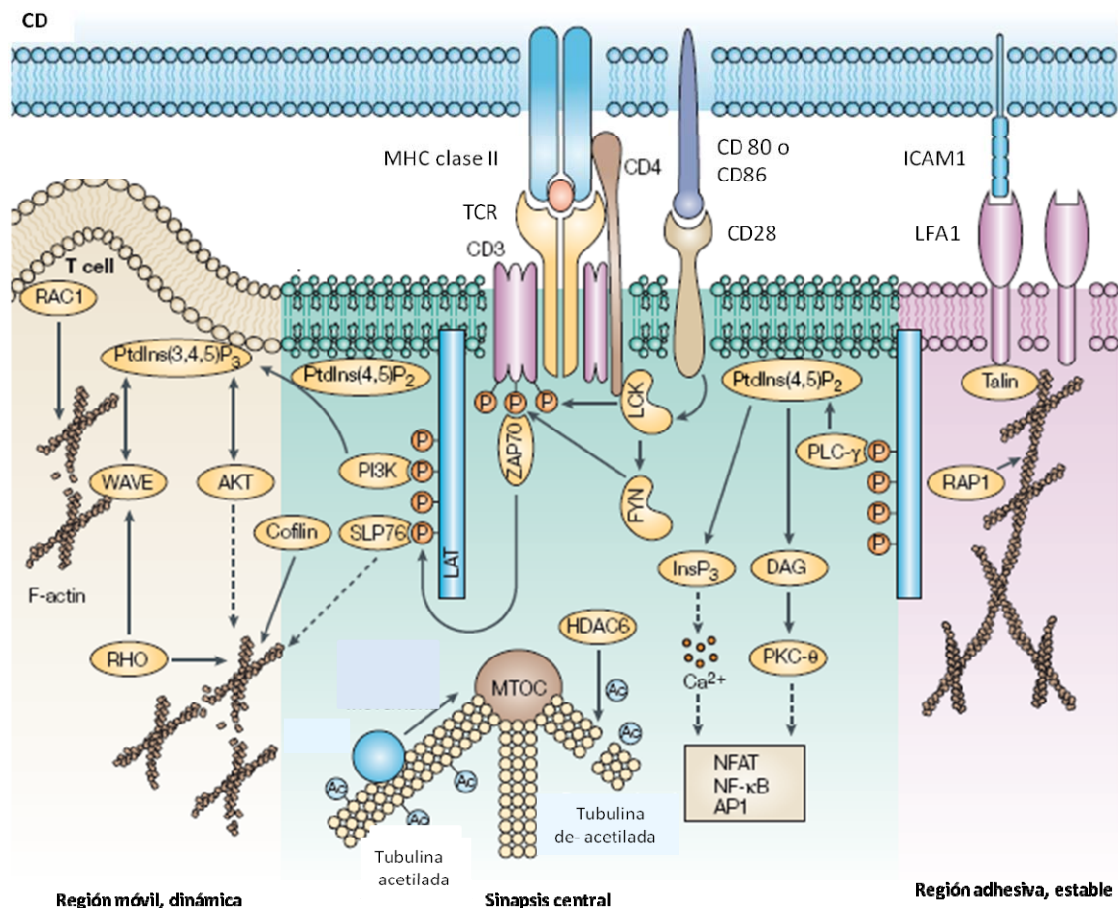


Figura 9. Topografía molecular de la sinapsis inmunológica a nivel del linfocito T. La zona central que contiene el TCR se encuentra rodeada por regiones dinámicas de alta reorganización del citoesqueleto, y por regiones más estables que permiten la interacción entre las integrinas y la consiguiente adhesión entre las dos células. Tras el reconocimiento del antígeno por parte del TCR se activa toda una cascada de reorganización molecular y de señalización, que permiten la activación del linfocito T. Adaptado de (Friedl, den Boer et al. 2005).

3.2 Estructura de la sinapsis inmunológica en la célula dendrítica

Pese a la poca información que se tiene con respecto a esta región, los datos sugieren que la sinapsis inmunológica en la CD (SI-CD) presenta, al igual que ocurre en la SI-T, proteínas de superficie, proteínas estructurales del citoesqueleto y componentes de señalización.

3.2.1 Proteínas de superficie en la región SI-CD.

Moléculas fundamentales para la formación de la sinapsis son los ligandos de las integrinas ICAM-1 e ICAM-3, los cuales aparecen formando un anillo en la parte exterior de la SI-CD, uniéndose a la integrina LFA-1 presente en el linfocito (Barreiro, de la Fuente et al. 2007).

Otra de las proteínas que aparecen en la SI-CD es el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II), el cual interacciona con el CD3 presente en el linfocito. Las CDs sin embargo, son capaces de formar sinapsis con el linfocito incluso en ausencia de moléculas MHC I ó MHC II, lo que sugiere que no son imprescindibles para la formación de la misma (Revy, Sospedra et al. 2001).

Entre estas moléculas de superficie se encuentra también CD40, localizada en la región central de la SI-CD (Boisvert, Edmondson et al. 2004); B7-1 y B7-2 que se unen a CTLA-4 y CD28 en el linfocito respectivamente (Pentcheva-Hoang, Egen et al. 2004); y CD70, una proteína transmembrana relacionada con TNF, que interacciona con CD27 en el linfocito, siendo fundamental dicha unión para cebar las células T (Keller, Groothuis et al. 2007).

También se encuentra en esta región el receptor de semaforina Plexin-A1 (Eun, O'Connor et al. 2006), el cual colocaliza con su co-receptor neuropilina. La interferencia con neuropilina empleando anticuerpos neutralizantes inhibe la correcta unión del linfocito con la CD y en consecuencia, la proliferación de los linfocitos T inducida por las CDs (Cemerski, Das et al. 2007).

El receptor Notch y sus ligandos (*Delta like 1* y *Jagged 1*) también se han localizado en la SI-CD, situados en el anillo externo y en la región central respectivamente. Se ha visto que tras la formación de la sinapsis tiene lugar un procesamiento de los dominios intracelulares del receptor Notch, los cuales se acumulan en el núcleo de la CD, regulando la expresión génica de la misma (Luty, Rodeberg et al. 2007).

3.2.2 Proteínas del citoesqueleto en la región SI-CD.

En la región citoplásmica de la SI-CD hay una reorganización y acumulación de F-actina y fascina (Al-Alwan, Rowden et al. 2001; Riol-Blanco, Delgado-Martin et al.

2009). Esta reorganización que se produce en el citoesqueleto de actina es fundamental para la unión con el linfocito T y su consiguiente activación, pudiendo ser importante para la activación de determinadas proteínas como la integrina LFA-1 ($\alpha\text{L}\beta\text{2}$). Además, esta reorganización y polarización de la actina, solo tiene lugar cuando se forma una sinapsis antígeno específica (Al-Alwan, Liwski et al. 2003).

Los microtúbulos también juegan un papel importante en la organización de la SI-CD, formando largas cadenas originadas en el MTOC que se orientan hacia la zona de unión con el linfocito, uniendo proteínas transportadoras de diversas moléculas como MHC II y CD70 (Boes, Cerny et al. 2002; Keller, Groothuis et al. 2007; Vyas, Kim et al. 2007).

3.2.3 Moléculas de señalización en la región SI-CD.

En la región SI-CD se puede observar una acumulación de proteínas fosforiladas en tirosina, lo que indica que se trata de una región señalizadora muy activa (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009).

Están también presentes una serie de moléculas reguladoras de actina como el fosfatidil inositol 4,5-difosfato (PI(4,5)P₂) (Fooksman, Shaikh et al. 2009) y la fosfoproteína vasodilatadora (VASP) (Fisher, Bulur et al. 2008); la quinasa Akt, que participa en la regulación de la supervivencia de la CD (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009), y proteínas adaptadoras como la espinofilina, descrita en sinapsis neuronales (Bloom, Unternaehrer et al. 2008). Asimismo, la pequeña GTPasa Rho, fundamental para la regulación del citoesqueleto de actina, se activa en respuesta a la estimulación por el receptor de Plexina-1 (Eun, O'Connor et al. 2006).

3.3 Dinámica de la sinapsis inmunológica.

El desarrollo de la sinapsis inmunológica *in vivo* en los ganglios linfáticos tiene lugar en cinco fases (Miller, Safrina et al. 2004), o en tres fases secuenciales según diferentes autores (Mempel, Henrickson et al. 2004). En cualquiera de los casos, la progresión a través de estas fases requiere interacciones mantenidas entre el complejo MHC y el TCR, señalización constante a través de las membranas celulares y un citoesqueleto en perfectas condiciones tanto en el linfocito como en la CD (Friedl, den Boer et al. 2005).

- **Fase I o de contactos estocásticos:** esta primera fase tiene lugar cuando los linfocitos T se aproximan a las CDs de forma aleatoria, llevándose a cabo contactos exploratorios de algunos minutos, con las extensiones dendríticas de las CDs (Miller, Hejazi et al. 2004). Si durante estos contactos el linfocito no detecta el péptido apropiado unido al complejo MHC, pasa rápidamente a otra CD permitiendo así que cada CD

interacciones con miles de linfocitos T por hora (Miller, Wei et al. 2003; Wei, Parker et al. 2003). Estos contactos se ven favorecidos además por la localización próxima a las HEV de las CDs, permitiendo así que los nuevos linfocitos que llegan interactúen con ellas (Bajenoff, Granjeaud et al. 2003).

- **Fase II o de interacciones transitorias:** si durante la fase I el linfocito detecta el antígeno adecuado unido al complejo MHC, entran en una segunda etapa que implica contactos más duraderos con las CDs, así como una disminución en la velocidad del propio linfocito debido a la unión entre ICAM-1 y LFA1 (Dustin, Bromley et al. 1997). Tras unas dos horas de interacciones intermitentes entre ambas células, muchos de los linfocitos T sobre expresan el marcador de activación temprana CD69 (Mempel, Henrickson et al. 2004). En esta etapa se produce una intensa señalización iniciada por calcio (Gunzer, Schafer et al. 2000) y seguida por el reclutamiento de moléculas de señalización como CD3, LCK, ZAP70, etc. (Freiberg, Kupfer et al. 2002; Huppa, Gleimer et al. 2003).
- **Fase III o de formación de clústers de linfocitos T:** es una fase más duradera de unas 12-14 horas, durante las cuales los linfocitos establecen contactos de larga duración (más de 60 minutos) con las CDs (Miller, Safrina et al. 2004). Esta etapa de maduración del linfocito T está caracterizada por una segregación molecular en la membrana del mismo que da lugar a la formación del cSMAC y del pSMAC (Egen and Allison 2002; Freiberg, Kupfer et al. 2002). Además se produce el reclutamiento de receptores de citoquinas como el receptor de interferón- γ (IFN- γ R) y el receptor de interleucina-4 (IL-4R), actuando como co-estimuladores (Maldonado, Irvine et al. 2004).
- **Fase IV o de resolución de la sinapsis:** en esta etapa los linfocitos comienzan a disociarse de las CDs, aunque presentan una velocidad y una motilidad menor que los linfocitos T naive (Miller, Wei et al. 2002). Durante la separación, algunas porciones de la membrana del linfocito pueden quedar unidas a la CD y viceversa (Stinchcombe, Bossi et al. 2001; Wetzel, McKeithan et al. 2002). A partir de este momento los linfocitos adquieren una forma más alargada y migran lentamente entre las CDs presentes en el ganglio, estableciendo interacciones dinámicas que aumentan las señales antigénicas previas y pueden ser consideradas como un punto de control adicional (Miller, Wei et al. 2002). Lo que aún no se sabe es si la resolución de la sinapsis es un pre-requisito o una consecuencia de la separación celular.

- **Fase V o de proliferación de los linfocitos:** una vez que el linfocito se separa de la CD comienza una etapa proliferativa, dividiéndose aproximadamente cada 8 horas (Miller, Hejazi et al. 2004).

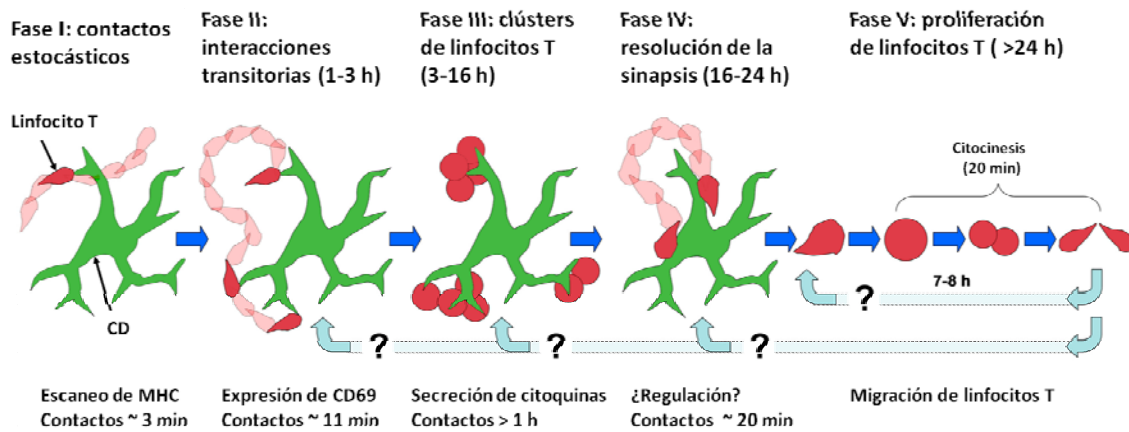


Figura 10. Etapas del reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T. Adaptado de (Miller, Safrina et al. 2004). En primer lugar se produce una fase de contactos estocásticos, seguida de una serie de interacciones transitorias hasta la formación de clústers de linfocitos T. Transcurridas unas 16-24 horas, se produce la resolución de la sinapsis, y la proliferación de los linfocitos T.

4. LA AUTOFAGIA

4.1 Características generales y tipos de autofagia

La autofagia es un proceso degradativo mediante el cual las células reciclan componentes citosólicos y orgánulos intracelulares tras su degradación en lisosomas (Mizushima, Levine et al. 2008). Existen tres tipos de autofagia clasificados de acuerdo con la forma en que los compuestos a degradar alcanzan el lisosoma: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas o CMA y microautofagia (figura 11).

La autofagia mediada por chaperonas (CMA) es una forma selectiva de autofagia por la cual proteínas citosólicas con un motivo peptídico específico son reconocidas por la chaperona Hsc70 e individualmente dirigidas a los lisosomas para su degradación (Cuervo 2010).

La microautofagia es la forma más desconocida de autofagia. Implica la invaginación o evaginación de la membrana lisosomal hacia su interior, transportando directamente pequeñas porciones de citoplasma por pinocitosis al lumen lisosomal (Sahu, Kaushik et al. 2011). Está activa en un estado de reposo y es responsable de la constante renovación de componentes intracelulares.

La macroautofagia es la forma más extensamente estudiada y en la que se centra este trabajo. En este tipo de autofagia se forma una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma (AP) para englobar partes del citoplasma, incluyendo orgánulos enteros. El AP se fusiona a continuación con un lisosoma, liberando su contenido para la degradación de los componentes que porta por acción de las hidrolasas lisosomales. Los aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos resultantes serán devueltos al citoplasma a través de permeasas presentes en la membrana lisosomal para su posterior utilización (Mizushima, Levine et al. 2008; Tanida 2011).

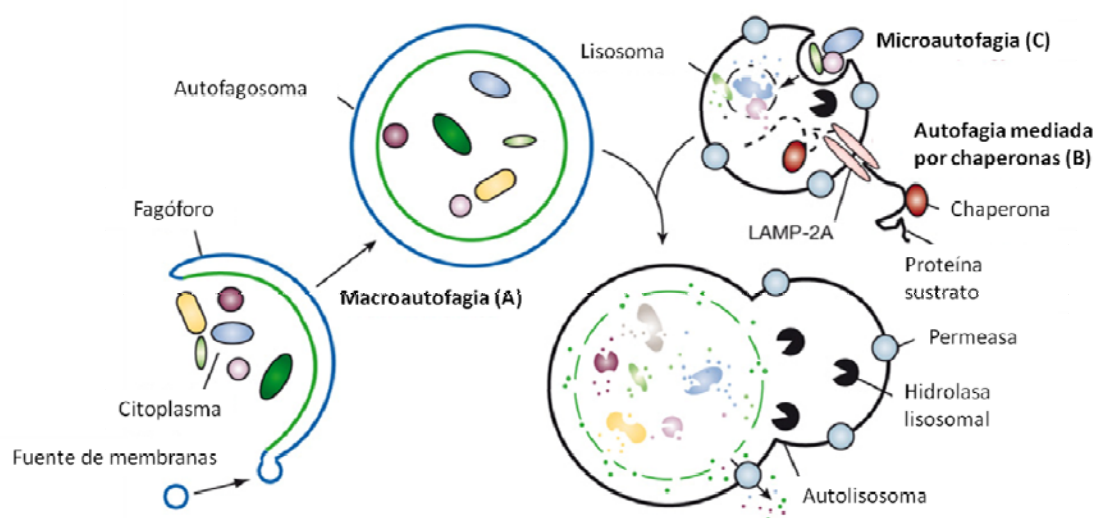


Figura 11: Tipos de autofagia en células de mamífero. A) Macroautofagia, que requiere el secuestro de sustratos en vesículas de doble membrana que se fusionan posteriormente con el lisosoma. B) CMA, donde los sustratos son reconocidos por chaperonas y transportados a los lisosomas para su degradación. C) Microautofagia, que implica el englobamiento directo de componentes citosólicos. Adaptado de (Mizushima, Levine et al. 2008).

4.2. Macroautofagia.

La macroautofagia (referida de ahora en adelante como autofagia) fue descubierta por Christian de Duve en 1959 en células de hígado de ratas (De Duve and Beaufay 1959), pero no fue hasta hace algo más de una década cuando se empezaron a conocer molecularmente sus mecanismos, gracias al descubrimiento de la familia de proteínas Atg (*autophagy-related genes*) que regulan este proceso en levaduras (Klionsky 2007). Actualmente se conocen más de 30 genes Atg, la mayor parte de los cuales se encuentran implicados en la formación de lo que se conoce como PAS (*PreAutophagosomal Structure*) descubierto en levaduras (Kim, Huang et al. 2002). La familia de las Atg se encuentra conservada desde levaduras hasta mamíferos, por lo que la autofagia es un mecanismo degradativo altamente conservado a lo largo de la evolución (Eskelinen 2008). Sin embargo, no todas las proteínas reguladoras de la autofagia presentes en mamíferos están presentes en procariotas o eucariotas inferiores,

por lo que algunas de las funciones de este proceso se han debido de ir adquiriendo con la evolución (Mizushima, Ohsumi et al. 2002; Hughes and Rusten 2007; Tanida 2011).

En los últimos años se han descrito numerosos procesos en los que la autofagia parece ser un mecanismo de degradación selectiva de orgánulos. Atendiendo al tipo de material degradado se distinguen varios tipos: mitofagia (mitocondrias dañadas) (Wang and Klionsky 2011), ribofagia (ribosomas) (Kraft and Peter 2008), pexofagia (peroxisomas) (Dunn, Cregg et al. 2005) y reticulofagia (retículo endoplasmático) (Bernales, McDonald et al. 2006).

La mitofagia es el tipo de autofagia selectiva más ampliamente estudiado. Se identificó en levaduras, donde está mediada por Atg32 (Okamoto, Kondo-Okamoto et al. 2009), y en mamíferos durante la diferenciación de los eritrocitos de la sangre, donde está mediada por BNIP3L (Mortensen, Ferguson et al. 2010). Además, la mitofagia está regulada en muchos tipos celulares de metazoos por la proteína Parkin y la quinasa PINK1 (Youle and Narendra 2011; Ashrafi and Schwarz 2013).

Estudios recientes revelan la existencia de determinados sustratos específicos de macroautofagia como las proteínas p62 y NBR1 (Itakura and Mizushima 2011; Shaid, Brandts et al. 2013). Ambas son capaces de funcionar como receptores o adaptadores autofágicos ya que interaccionan directamente con LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), una proteína fundamental para la formación del preautofagosoma, a través de una región denominada LIR (*LC3-interacting region*), lo que les permite conducir los sustratos hacia los autofagosomas para que sean degradados. Además, estas proteínas presentan un dominio de unión a ubiquitina a través del cual unen directamente proteínas mono o poliubiquitinadas que luego serán dirigidas a los autofagosomas para su degradación (Shaid, Brandts et al. 2013). Esta propiedad selectiva de autofagia mediada por receptores parece ser también un proceso conservado a lo largo de la evolución.

4.2.1 Fases de la autofagia y efectores moleculares.

La autofagia se puede dividir en cinco fases principales: (1) inducción o iniciación del proceso, (2) nucleación, (3) elongación de la membrana de aislamiento, (4) fusión del autofagosoma con el lisosoma o maduración y (5) reutilización de los compuestos resultantes. Algunas de las proteínas y procesos implicados en cada una de estas fases se detallan a continuación.

En la fase de inducción o iniciación (1) se encuentra implicado un complejo regulador clave formado por varias proteínas de la familia de las Atg, éstas son Atg1, cuyos ortólogos en mamíferos son ULK1 y ULK2 (*Unc-51-like kinase 1 y 2*) y FIP200 (Hara, Takamura et al. 2008). Ambos forman un complejo con Atg13 y Atg101, que se localiza en el fagóforo, estructura previa a la formación del preautofagosoma. ULK1 y 2

se autofosforilan y fosforilan a su vez a Atg13 y FIP200, lo que genera cambios conformacionales necesarios para la activación de la autofagia (Jung, Jun et al. 2009). El control de la autofagia se lleva a cabo mediante la regulación de la fosforilación de algunas proteínas de la familia Atg. Esta regulación implica rutas de señalización complejas e interconectadas, cuyo controlador central es mTOR, una serina/treonina quinasa que inhibe la autofagia tanto controlando la traducción y transcripción de genes Atg, como modificando las proteínas Atg e interfiriendo con la formación de autofagosomas. Bajo condiciones de alta concentración de nutrientes, mTOR hiperfosforila Atg13 impidiendo su asociación con Atg1, bloqueando así la autofagia (Lee, Kim et al. 2007; Jung, Jun et al. 2009). La inhibición de mTOR provoca la defosforilación de Atg13 y la consiguiente activación de la autofagia, además de incrementar la expresión de los genes *atg8* y *atg14* (He and Klionsky 2009).

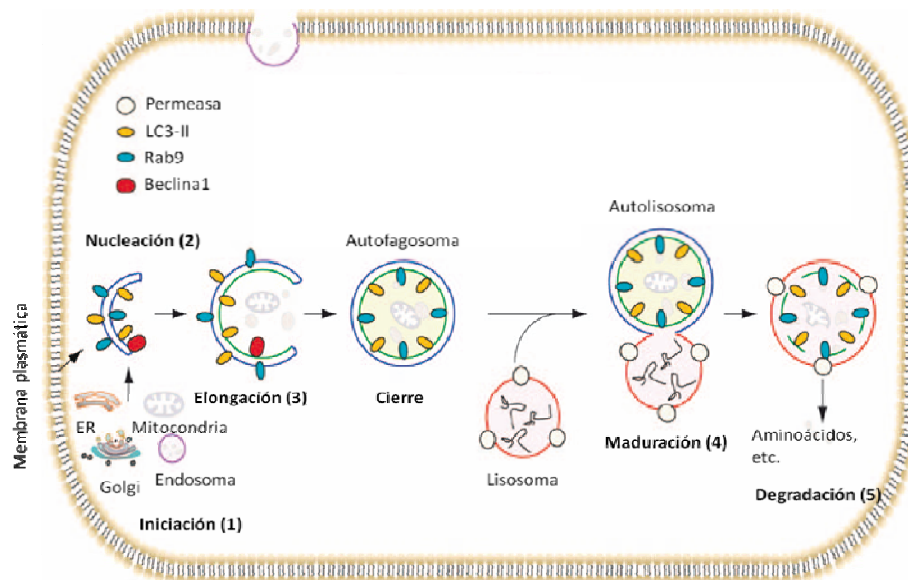


Figura 12: Representación esquemática de las fases de la macroautofagia. La autofagia se puede dividir en cinco fases principales: (1) inducción o iniciación, (2) nucleación, (3) elongación de la membrana, (4) fusión o maduración del fagosoma y (5) degradación. Adaptado de (Kang, Zeh et al. 2011).

El inicio de la nucleación o aislamiento de la membrana del fagóforo (2) es un proceso altamente regulado. Existen evidencias de que la cantidad de proteínas Atg presentes en él está relacionada con el tamaño y el número de vesículas que se formarán (Xie, Nair et al. 2008). El origen de estas membranas sigue siendo controvertido (Tooze and Yoshimori 2010). Existen evidencias de que podrían proceder del retículo endoplásmico (Li, Zhao et al. 2012), del Golgi (Takahashi, Meyerkord et al. 2011), de las mitocondrias (Hailey, Rambold et al. 2010) o de la membrana plasmática (Cuervo 2010). El complejo PI3K de tipo III (*Phosphoinositide 3 Kinase*) es fundamental en esta fase y participa en la biogénesis de la membrana del autofagosoma, posibilitando el aumento de tamaño del mismo a través del reclutamiento de proteínas citosólicas (Simonsen and Tooze 2009). Este complejo lo conforman numerosas proteínas entre las que destacan la PI3K Vps34, una serina/treonina kinasa, la PI3K Vps15 o p150 en

mamíferos, Atg14 y Beclina1. La proteína Beclina1 también forma parte del complejo implicado en la curvatura de la membrana de los autofagosomas integrado por UVRAG, Bif-1 y Ambra1 (Funderburk, Wang et al. 2010; Kang, Zeh et al. 2011).

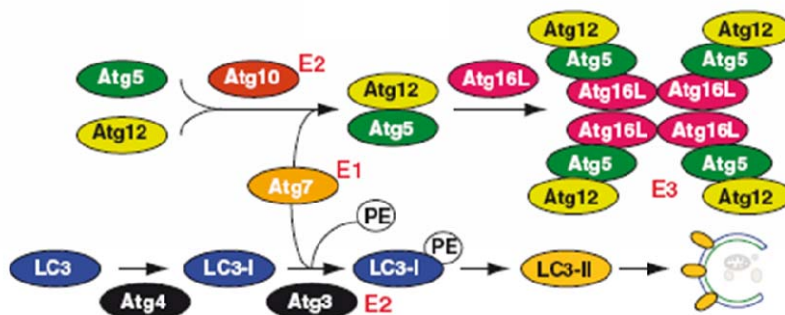


Figura 13. Etapa de elongación del fagóforo. Intervienen dos sistemas de conjugación mediante ubiquitinas que permiten el ensamblaje del complejo Atg16L y el procesamiento de LC3. Adaptado de (Kang, Zeh et al. 2011).

Este complejo, junto con otras proteínas Atg, recluta dos sistemas de conjugación similares a ubiquitina: el complejo Atg12-Atg5-Atg16L y el complejo Atg8/LC3-PE (fosfatidiletanolamina), que son así mismo necesarios para la formación del autofagosoma (3). La primera reacción de conjugación implica la conjugación de Atg12 con Atg5 gracias a la acción combinada de Atg7 y Atg10, ambas proteínas con actividad ubiquitina. El conjugado Atg5-Atg12 se asocia con la proteína Atg16L, lo que va seguido de una homodimerización de este complejo trimérico formándose un gran complejo multimérico denominado complejo Atg16L. La formación de esta estructura es fundamental para la correcta elongación de la membrana del preautofagosoma y se disociará de la membrana una vez que el autofagosoma se encuentra maduro (Mizushima, Noda et al. 1998; Simonsen and Tooze 2009).

La segunda reacción de conjugación afecta a la proteína LC3, también conocida como Atg8. La cisteína proteasa Atg4 reconoce y corta específicamente el extremo C-terminal de la proforma de LC3, dando lugar a la forma activa citosólica LC3-I (Tanida, Ueno et al. 2004). Este procesamiento inicial es esencial para que posteriormente LC3 se active por Atg7, se transfiera a Atg3 y finalmente sea modificado a la forma activa LC3-II, al conjugarse con un residuo de fosfatidiletanolamina (PE). LC3-II permanece en la membrana, incluso cuando el complejo Atg5-Atg12 se disocia, y controla el tamaño y la curvatura del autofagosoma (He and Klionsky 2009; Mehrpour, Esclatine et al. 2010).

La fracción de LC3-II que se encuentra en el interior del autofagosoma es degradado por las enzimas lisosomales; sin embargo, el que se encuentra en la superficie de la membrana externa del autofagolisosoma es liberado al citosol al cortar la proteasa Atg4 su unión al residuo de PE que le mantiene unido a la membrana (Tanida, Ueno et al. 2004). LC3-II es el marcador más fiable del proceso autofágico que

se ha descrito hasta la fecha, ya que es la única proteína en eucariotas superiores que claramente permanece asociada al autofagosoma completo; de hecho la cantidad relativa de LC3-II refleja la abundancia de autogafosomas en la célula (Mizushima 2004).

La fusión del autofagosoma con el lisosoma o maduración (4) se lleva a cabo en células de mamífero por las GTPasa lisosomales Rab7 (Jager, Bucci et al. 2004) y Rab33B entre otras, las cuales presentan un sitio de interacción con LC3. El material englobado es digerido en el interior de los lisosomas por enzimas como las catepsinas B, D y L (Tanida, Minematsu-Ikeguchi et al. 2005). El producto resultante son moléculas pequeñas, particularmente aminoácidos, que se transportan de nuevo al citosol mediante permeasas lisosomales (Mehrpour, Esclatine et al. 2010).

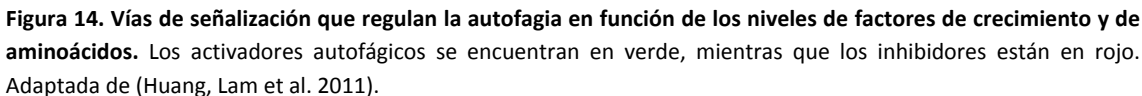
4.3 Procesos que regulan la autofagia.

La actividad autofágica celular normalmente es baja en condiciones basales, pero puede activarse notoriamente ante numerosos estímulos como ayuno de nutrientes, estrés energético, hipoxia, estrés oxidativo, daño mitocondrial, o patógenos entre otros (Kroemer, Marino et al. 2010). Se trata de un proceso altamente dinámico, puesto que se estima que el tiempo transcurrido entre la formación y la degradación del autofagosoma en condiciones normales está en torno a los diez minutos (Mizushima and Klionsky 2007).

4.3.1 Ayuno de nutrientes y factores de crecimiento.

El estímulo más estudiado ha sido el ayuno de nutrientes, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, y supone el estímulo más potente como inductor de autofagia. En la mayoría de los cultivos de células de mamífero, el ayuno de nutrientes induce autofagia en cuestión de minutos como mecanismo de supervivencia, lo que se incrementa todavía más si hay una ausencia simultánea tanto de nutrientes (aminoácidos y glucosa) como de factores de crecimiento (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005; Mizushima, Yoshimori et al. 2010). Los sensores clásicos de niveles de nutrientes, que activan el crecimiento y la división celulares e inhiben la autofagia, son la ruta de mTOR y la ruta de AMPK.

La ruta de mTOR se ve inhibida también ante la ausencia de factores de crecimiento y nutrientes. En estas condiciones se activan moléculas como Akt, AMPK o ERK1/2, que pueden fosforilar una o dos de las subunidades del complejo TSC1/TSC2, o incluso Raptor en el caso de Akt, produciéndose así la inactivación de mTOR y la consiguiente activación de la ruta autofágica. Este complejo también se puede ver inhibido por acción de la familia de GTPasas Rag, que en ausencia de nutrientes interaccionan con Raptor, bloqueando la acción de mTOR (Efeyan and Sabatini 2010; Kroemer, Marino et al. 2010)



Las infecciones o exposiciones a agentes patógenos constituyen una forma especializada de estrés celular que en muchos casos resulta en la inducción de la autofagia (Sumpter and Levine 2010).

La inducción de la autofagia durante la infección puede producirse por citoquinas como el interferón γ (IFN γ) así como también por el receptor de reconocimiento de patógenos (PRRs), el cual reconoce componentes conservados de los patógenos o productos de su replicación (PAMPs). (Virgin and Levine 2009; Kroemer, Marino et al. 2010).

Otro aspecto importante en la relación entre autofagia e inmunidad es el papel que presenta el proceso autofágico en la presentación antigénica y la homeostasis de células T. La autofagia contribuye a la presentación de antígenos citosólicos por el MHCII, siendo fundamental para la selección tanto positiva como negativa de los linfocitos T naive (Nedjic, Aichinger et al. 2008).

Las células eliminan las mitocondrias que se encuentran dañadas para prevenir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El proceso de autofagia selectiva destinado a la eliminación de mitocondrias se denomina mitofagia.

En respuesta a potenciales peligros o daños, la membrana mitocondrial se puede permeabilizar mediante múltiples rutas bioquímicas. La permeabilización de la membrana mitocondrial constituye uno de los fenómenos clave que determina la muerte apoptótica o necrótica de la célula (Kroemer, Galluzzi et al. 2007), lo que puede prevenirse mediante la eliminación autofágica de las mitocondrias dañadas. El reconocimiento autofágico de las mitocondrias despolarizadas está mediado por la proteína quinasa PINK1. En condiciones normales, PINK1 se recluta en la mitocondria de manera continua, pero sufre una proteólisis dependiente de voltaje, lo que permite su eliminación y degradación (Narendra, Jin et al. 2010). Al producirse la despolarización de la mitocondria, PINK1 se acumula rápidamente en la superficie mitocondrial facilitando el reclutamiento de Parkina, una E3 ubiquitina ligasa (Narendra, Jin et al. 2010), que se encarga de ubiquitinar diferentes sustratos mitocondriales como la proteína VDAC1 y de reclutar moléculas adaptadoras como p62/SQSTM1, marcando así la mitocondria para su degradación (Geisler, Holmstrom et al. 2010).

En algunos tipos celulares como los fibroblastos embrionarios (MEFs) se ha visto que la mitofagia inducida por despolarización requiere la participación de BNIP3L o NIX (Novak, Kirkin et al. 2010). Hasta el momento, la relación funcional entre la mitofagia dependiente de NIX y la dependiente de PINK1/Parkina, no ha sido completamente dilucidada.

4.3.4 Estrés oxidativo.

La excesiva acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) produce estrés oxidativo en la célula, una condición en la que constituyentes celulares, incluyendo proteínas, DNA y lípidos, son oxidados y dañados. Esta acumulación de ROS induce la activación de la autofagia con el fin de modular la homeostasis celular (Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007). En la célula hay dos sitios principales de producción de ROS: las mitocondrias, que producen ROS como consecuencia de la respiración celular, y las NADPH-oxidasas (NOX), que producen superóxido en neutrófilos y fagosomas. Numerosos estudios apuntan a la mitocondria como principal fuente de los ROS implicados en la regulación de la autofagia (Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007), mientras que las NOX contribuyen a una activación selectiva de autofagia, la autofagia bacteriana (Scherz-Shouval and Elazar 2011).

Existe una gran controversia acerca de los mecanismos mediante los cuales los ROS inducen autofagia. Se pueden diferenciar dos tipos de interacciones: efectos directos de los ROS en proteínas Atg y efectos indirectos. La proteína Atg4 es una proteasa esencial en el proceso autofágico que se ha identificado como una diana directa para la oxidación por ROS, concretamente el residuo de cisteína⁸¹, presente cerca del centro catalítico de la proteína. La oxidación de este residuo produce la inactivación de la actividad proteasa de Atg4 y previene la delipidación de LC3, pero no afecta al extremo C-terminal de la proteína que se encarga del procesamiento de LC3,

permitiendo así que se produzca un aumento en la formación de autofagosomas (Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007).

Se piensa que los efectos indirectos de los ROS sobre la autofagia están mediados principalmente por AMPK, la cual se fosforila en el residuo de treonina 172 de la subunidad catalítica 1 α (Choi, Kim et al. 2001). Esta respuesta frente a los altos niveles de ROS está mediada también por la quinasa ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), que es fundamental para organizar las respuestas celulares por daño en el DNA y además tiene la capacidad de incrementar la actividad de TSC2 por vía LKB1/AMPK, lo que desencadena la inactivación de mTOR (Alexander, Cai et al. 2010).

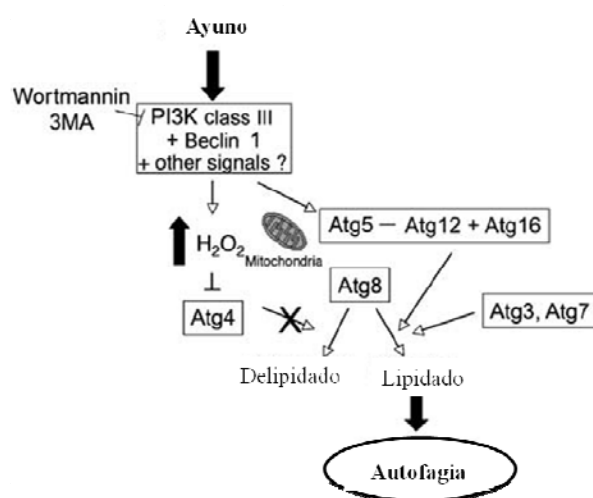


Figura 16. Modelo propuesto para la regulación redox de la autofagia a través de la proteasa Atg4. La liberación de ROS desde la mitocondria, entre ellos H_2O_2 , inhibe a Atg4, limitando la acción delipidante de ésta sobre LC3 (Atg8) y permitiendo así que aumenten los niveles de esta proteína disponibles para la formación de autofagosomas. Adaptado de (Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007).

La proteína nuclear HMGB1 (*High mobility group box 1*) también es capaz de responder a estímulos inductores de autofagia de manera dependiente de ROS, promovándose su traslocación del núcleo al citoplasma donde rompe la interacción entre Beclina1-Bcl2, activándose así la autofagia. Se ha visto además que la pérdida de enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasas 1 y 2 (SOD1 y SOD2) puede desencadenar la traslocación citoplásmica de HMGB1 (Tang, Kang et al. 2010).

Estas especies reactivas de oxígeno actúan también produciendo un efecto inhibitorio sobre reguladores positivos de la autofagia, como es el caso de las proteínas Atg3, Atg7 y Atg10, que ven afectadas por oxidación las cisteínas presentes en sus centros catalíticos con la consiguiente inactivación (Filomeni, Desideri et al. 2010).

5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO.

5.1 Especies reactivas de oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) representan la clase más importante de radicales generados en los sistemas vivos (Valko, Leibfritz et al. 2007). Se trata de moléculas pequeñas, con un tiempo de vida corto y altamente reactivas, que se forman por una incompleta reducción del oxígeno. Bajo este término se incluyen aniones de oxígeno, radicales libres como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), y peróxidos como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Scherz-Shouval and Elazar 2011)

El oxígeno se encuentra en la naturaleza en forma de di-oxígeno (O_2), siendo una molécula de escasa reactividad. Sin embargo, su reducción mediante la transferencia de un electrón origina el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ($O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$).

Existen diversas fuentes de producción de $O_2^{\cdot-}$ *in vivo*. Múltiples moléculas incluidas la adrenalina, compuestos tiólicos y glucosa pueden oxidarse en presencia de oxígeno y producir $O_2^{\cdot-}$, reacciones que pueden ser aceleradas por la presencia de metales de transición como el hierro o el cobre (Young and Woodside 2001). Sin embargo, la producción de $O_2^{\cdot-}$ tiene lugar principalmente en la mitocondria, concretamente en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones (Buonocore, Perrone et al. 2010; Finkel 2011).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede producirse de dos formas: por dismutación del superóxido ($2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+ + H_2O_2 + O_2$), o por una reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones ($2 O_2 + 2 e^- + 2 H^+ + H_2O_2$). Tradicionalmente al H_2O_2 se le ha atribuido un efecto deletéreo, al igual que ocurre con el $O_2^{\cdot-}$, debido a su capacidad de descomponerse fácilmente dando lugar a radicales hidroxilo (OH^{\cdot}). Sin embargo, en los últimos años se ha visto que estas especies reactivas de oxígeno tienen la capacidad de actuar como moléculas de señalización tanto en el interior como en el exterior celular, especialmente el H_2O_2 debido a su capacidad para atravesar las membranas celulares y a que tiene una vida media más larga comparada con los otros ROS (Finkel 2011; Holmdahl, Sareila et al. 2012).

5.2 Fuentes de especies reactivas de oxígeno en la célula.

En la célula existen dos fuentes principales de ROS: la mitocondria, que produce ROS como subproducto de la respiración, y las NADPH-oxidasas (NOX) que producen activamente $O_2^{\cdot-}$ en las membranas.

5.2.1 La mitocondria como fuente generadora de ROS.

La mitocondria es un orgánulo donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), la oxidación de ácidos grasos, la

biosíntesis de los grupos hemo y el metabolismo de los aminoácidos (Duchen and Szabadkai 2010; Wallace, Fan et al. 2010). Regula también la muerte apoptótica de las células, así como la modulación de los flujos de calcio (Mammucari, Patron et al. 2011).

Las mitocondrias además, se mueven por toda la célula de manera coordinada por el citoesqueleto, y sufren continuos ciclos de fisión y fusión que están íntimamente relacionados con la apoptosis y la eliminación de mitocondrias disfuncionales (Green, Galluzzi et al. 2011; Gomes and Scorrano 2013). Las macromoléculas que se dañan dentro de la mitocondria son degradadas por enzimas intramitocondriales especializadas, y las mitocondrias dañadas se eliminan por autofagia o mitofagia (Narendra and Youle 2011).

La principal función de la mitocondria es la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa a lo largo de la cadena respiratoria, lo que produce una importante cantidad de ROS. Esta cadena respiratoria mitocondrial está compuesta por cuatro complejos enzimáticos (I-IV), que se encargan de la transferencia de electrones desde equivalentes reductores de NADH y FADH hasta el oxígeno, generando así el potencial de membrana que permite la síntesis de ATP. Estos complejos enzimáticos están constituidos por subunidades codificadas tanto por el ADN genómico como por el mitocondrial, a excepción del complejo II (Smith, Hartley et al. 2012).

Los electrones procedentes de carbohidratos oxidados en el TCA o de ácidos grasos degradados por β -oxidación, se acumulan en el transportador de electrones NADH. Este NADH es oxidado a NAD^+ en el complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) y los electrones se transfieren a la coenzima Q (CoQ), un transportador lipofílico de electrones existente como ubiquinona oxidada (Q) y como ubiquinol reducido (QH_2). La energía obtenida en el complejo I es empleada para bombear protones a través de la membrana mitocondrial interna. Los electrones procedentes del TCA pueden acceder también vía succinato y a través de la CoQ al complejo II (succinato:ubiquinona reductasa), el cual carece de la capacidad de bombear protones (Smith, Hartley et al. 2012).

Los electrones de la CoQ pasan al complejo III (ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa) y de ahí al citocromo C, desde donde son utilizados para reducir el oxígeno a agua en el complejo IV (citocromo c oxidasa). Tanto en el complejo III como en el complejo IV la energía es usada para bombear protones a través de la membrana interna, generándose una fuerza motora que determina el potencial de membrana mitocondrial. Este potencial de membrana es empleado posteriormente para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato por la F_0F_1 ATP sintasa (Smith, Hartley et al. 2012).

La transferencia de electrones hasta el oxígeno origina agua, pero también se producen transferencias parciales de electrones, especialmente en los complejos I y III, que originan gran cantidad de $\text{O}_2^{\cdot-}$ que se transformará en H_2O_2 y otros ROS (Murphy 2009). La producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ aumenta en muchas situaciones patológicas, y la mitocondria es particularmente susceptible al daño oxidativo al ser un orgánulo que

contiene numerosos centros de hierro y azufre, una membrana interna que presenta ácidos grasos insaturados y gran cantidad de proteínas y moléculas de DNA mitocondrial (Murphy 2009).

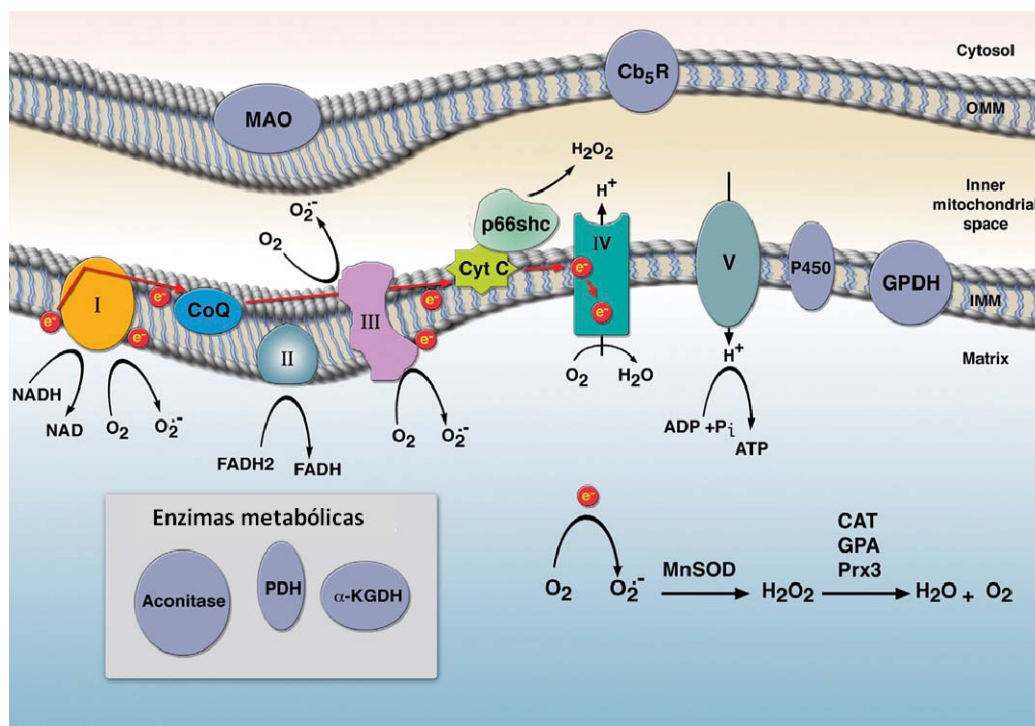


Figura 18: Generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria. La mitocondria es la principal fuente productora de ROS, especialmente en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones. Adaptado de (Finkel 2011).

5.2.2 Otras fuentes generadoras de ROS.

Existen otras fuentes generadoras de ROS en el interior de la célula a parte de la mitocondria, como es el caso de las NADPH-oxidasas (NOX) y una serie de enzimas intracelulares entre las que se encuentran la xantina oxidasas, las ciclooxigenasas y las lipooxigenasas; y orgánulos como los peroxisomas o incluso el retículo endoplásmico, durante el proceso de plegamiento de proteínas y la formación de enlaces disulfuro (Huang, Lam et al. 2011).

5.3 Estrés oxidativo y agentes detoxificantes de ROS.

El estrés oxidativo se ha definido como un desequilibrio entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes en favor de las primeras (Chance, Sies et al. 1979). Este estrés en la célula se origina como consecuencia de una acumulación de

ROS, capaces de producir un daño en diferentes componentes celulares por oxidación. Sin embargo, se ha descubierto más recientemente que moderados niveles de ROS son fundamentales para una correcta señalización dentro de la célula, motivo por el cual es fundamental una adecuada regulación de sus niveles a través de los diferentes sistemas antioxidantes. Estos sistemas antioxidantes incluyen moléculas de bajo peso molecular como el glutathion, así como también gran cantidad de proteínas antioxidantes con diferentes localizaciones subcelulares y actividades químicas específicas como son por ejemplo la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la peroxirredoxina, la tiorredoxina y la glutarredoxina (Finkel 2011).

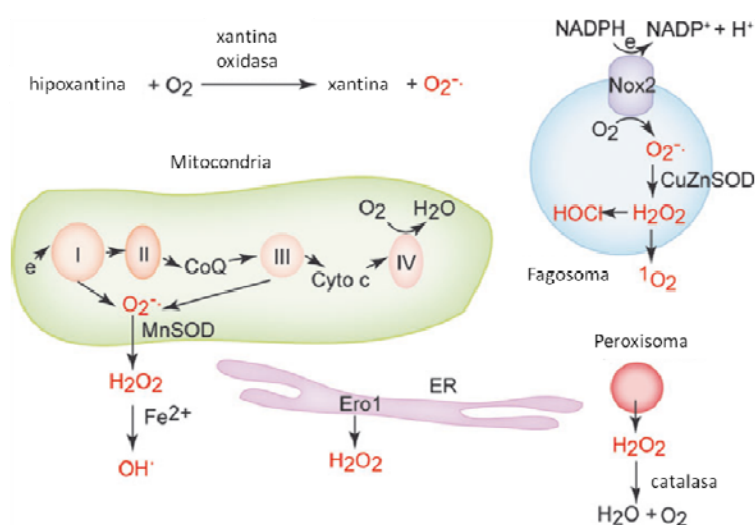


Figura 20. Fuentes intracelulares de ROS. Los aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se generan por la xantina oxidasa en una reacción de oxidación de la hipoxantina a xantina, por la NADPH oxidasa, y por la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Otras fuentes de ROS son el retículo endoplásmico y el peroxisoma. Adaptada de (Huang, Lam et al. 2011).

En los últimos años se han encontrado evidencias de que la regulación de los niveles de antioxidantes en la célula está íntimamente relacionado con los niveles de ROS intracelulares (Finkel 2011). Un ejemplo de esta situación es la familia de factores de transcripción FoxO, que ven alterada su localización celular en función del estado redox de la célula, regulando así la expresión de varios genes que codifican para proteínas antioxidantes (de Keizer, Burgering et al. 2011). Este fenómeno también se extiende a los orgánulos productores de ROS. La biogénesis de mitocondrias en mamíferos por ejemplo, está regulada por el coactivador transcripcional PGC-1 α , el cual regula de manera simultánea la expresión de proteínas antioxidantes (St-Pierre, Drori et al. 2006). Esta coordinación permite a la célula mantener su homeostasis redox, fundamental para su correcto funcionamiento.

OBJETIVOS

En esta Tesis Doctoral nos planteamos como objetivo general el estudio de las funciones reguladas por la sinapsis inmunológica en las células dendríticas. Los objetivos específicos que nos planteamos fueron los siguientes:

- 1) Analizar si la formación de la sinapsis inmunológica produce estrés oxidativo en la célula dendrítica.
- 2) Identificar la fuente productora de radicales libre de oxígeno (ROS) en la célula dendrítica tras la formación de la sinapsis inmunológica.
- 3) Estudiar si la sinapsis inmunológica induce autofagia en la célula dendrítica.
- 4) Determinar la función de la autofagia en la célula dendrítica tras la formación de la sinapsis inmunológica.
- 5) Investigar el efecto que ejercen los ROS producidos en la célula dendrítica tras la formación de la sinapsis inmunológica, sobre la activación de los linfocitos T.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos generales

Los colorantes vitales CFSE (carboxifluoresceín diacetato succinimidil éster), CMTMR (5-(y -6) (((4-clorometil) benzoil) amino) tetrametil rodamina) y CMAC (7-amino-4-clorometil cumarina) son de Molecular Probes, así como también el MitoTracker Deep Red FM (usado a 300 nM), el CellROX Green (usado a 50 μ M) y el marcador de potencial de membrana mitocondrial JC-1 (usado a 1 μ M). La poli-ornitina, el Hoechst 33342, la albúmina de suero bovino (BSA), el LPS (lipopolisacárido, usado a 1 μ g/ml), la pepstatina A, el E-64d ((2S, 3S)-trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-3-metilbutano etil éster), la dihidroetidina (DHE, usado a 50 μ M), el CCCP (carbonil cianida 3-clorofenil hidrazona), y la L-glutamina se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). El péptido OVA (323-339), usado a 10 μ g/ml, se obtuvo de GenScript Corporation. El inhibidor del complejo III mitocondrial MitoQ₁₀ (fosfonio [10-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexaniden-1-il) decyl] trifenil metanosulfonato) así como su control decil-TPP (deciltrifenilfosfonio), fueron cedidos por el Dr. Mike Murphy (Medical Research Council, Cambridge, Reino Unido).

Los anticuerpos conjugados a PE anti-CD4, anti-CD205, anti-CCR7, anti-MHCII, anti-CD69 y el isotipo control anti-IgG2a son de Biolegend (San Diego, CA), así como también los anticuerpos conjugados a FITC anti-CD11b, anti-CD8a y anti-CD86. El anticuerpo anti-CD16/32 es de eBioscience (San Diego, CA).

El anticuerpo anti LC3B es de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). El anticuerpo anti-Atg5 se obtuvo de Abnova (Taipei, Taiwan). Los anticuerpos anti-fosfo-LAT (Y132) y anti-fosfo-ZAP70 (Y315+Y319) son de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Los anticuerpos anti-Atg12 (C-6), anti-Parkina (PRK8), anti-TOM20, anti-fosfo-PKC θ (Thr538), anti-fosfo-S6k (Thr421/Ser424) y anti-p62 se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos anti-Bclina1 y anti-PINK1 son de Novus Biologicals (Cambridge, Reino Unido).

2. Animales de experimentación

El trabajo se ha realizado utilizando ratones C57BL/6J procedentes de The Jackson Mice Laboratories (Bar Harbor, ME, EE.UU.), y ratones transgénicos OTII, GFP-LC3, Cd11C-Cre, Atg5^{flox/flox}, y Atg5 knock out (KO), todos con fondo genético C57BL/6J.

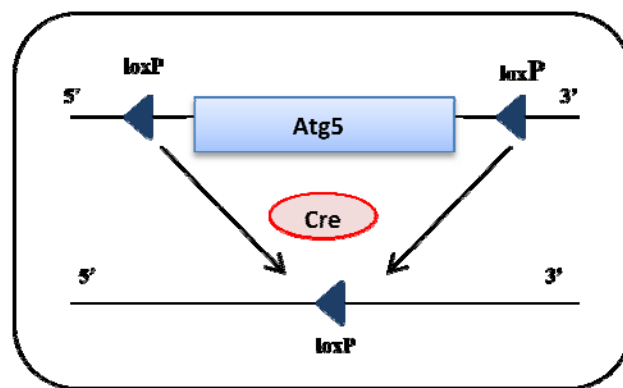
Los ratones OTII se caracterizan por la presentación de un TCR transgénico V α 2V β 5, específico para el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ en el contexto de IA^b (Barnden M.J. et al. 1998).

Los ratones transgénicos GFP-LC3 y $Atg5^{flox/flox}$ fueron cedidos por la Dra. Patricia Boya (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid). Los ratones GFP-LC3 se caracterizan por presentar insertada en su genoma la construcción del gen LC3 asociado al gen que codifica la proteína verde GFP, todo ello bajo el control de un promotor de expresión constitutiva (Mizushima et al, 2004). Esto supone que dicha línea de ratones transgénicos presenta una ligera sobreexpresión del gen de interés LC3 (que en ningún caso altera la expresión del gen endógeno ni los niveles normales de la proteína que codifica), cuya expresión puede seguirse fácilmente ya que la proteína a la que da lugar es visualizable utilizando un microscopio de fluorescencia.

Los ratones $Atg5^{flox/flox}$ contienen dos regiones loxP flanqueando al exón 3 del gen *Atg5*, de forma que al cruzarlos con otros ratones que tengan en su genoma la secuencia de una enzima recombinasa de tipo Cre, como es nuestro caso, el gen *Atg5* será eliminado del genoma de las células donde actúe dicha enzima.

Los ratones Cd11c-Cre fueron cedidos por el Dr. David Sancho (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid). Estos ratones se caracterizan por expresar la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la integrina alfa X murina (Cd11c). La expresión de esta recombinasa Cre se puede detectar en CDs $CD8^-$ y $CD8^+$, en CDs de tejidos derivadas de los nódulos linfáticos y en CDs plasmacitoides.

Los ratones *Atg5* KO se obtuvieron mediante el cruce de los ratones $Atg5^{flox/flox/}$ con los ratones Cd11c-Cre. De esta forma en todas aquellas células donde se exprese la recombinasa, es decir en las CDs, el gen *Atg5* será eliminado del genoma, mientras que en el resto de las células del ratón, este gen seguirá estando presente (esquema 1)



Esquema 1: Representación del flanqueamiento del gen *atg5* y su eliminación mediante splicing a través de la enzima recombinasa Cre.

Los animales se mantuvieron en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas bajo condiciones libres de patógenos, y fueron tratados siguiendo las especificaciones del Comité de Ética del Centro de Investigaciones Biológicas con respecto al cuidado y uso de animales de experimentación.

2.1 Extracción del DNA genómico de colas de ratones adultos.

El DNA genómico se obtuvo a partir de un pequeño fragmento de la cola de ratones recién destetados, empleando el kit REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma).

2.2 Fenotipaje de ratones GFP-LC3 y genotipaje de ratones Atg5 KO.

Los animales GFP-LC3 se fenotiparon observando un fragmento de la cola sobre un portaobjetos al microscopio, iluminando con el láser 488 y comprobando la fluorescencia emitida, que es claramente verde si el ratón es positivo. No se realizó ningún genotipaje de estos ratones dado que en el laboratorio de la Dra. Patricia Boya se había comprobado anteriormente que el genotipo de estos ratones siempre coincidía con el resultado del fenotipado.

Para el genotipado de los ratones Atg5 KO se emplearon 4 µl de DNA genómico en un volumen final de 20 µl. La amplificación se llevó a cabo con el kit REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma) y el resultado de las amplificaciones se analizó en geles de agarosa al 2% (p/v) conteniendo 1 µg/ml de bromuro de etidio.

La detección del genotipo Atg5^{flox/flox} se realizó utilizando cuatro cebadores, dos para detectar el gen atg5 silvestre: A. 5'-GAATATGAAGGCACACCCCTGAAATG-3', B. 5'-GTACTGCATAATGGTTTAACTCTTGC-3'; y dos para detectar los alelos atg5^{flox}: C. 5'-ACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGG-3', D. 5'-CAGGGAATGGTGTCTCCAC-3' (Hara et al. 2006). Las condiciones de la PCR empleadas para la amplificación de la región fueron: 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C; para terminar, 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos.

La detección del genotipo Cd11c-Cre se realizó utilizando dos cebadores: A. 5'-GACAACTTCCCTCCTGGTCTCTG-3', B. 5'-CCCAGAAATGCCAGATTACG-3'. Las condiciones de la PCR empleadas para la amplificación fueron: 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 63°C, y 1:30 a 72°C; para terminar 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos.

3. Cultivos celulares

3.1 Células dendríticas obtenidas a partir de bazo de ratón.

Para la obtención de las CDs murinas se extraen los bazos de los ratones y se disgregan en PBS 5 mM EDTA, empleando el émbolo de una jeringuilla. A continuación la suspensión celular se pasa a través de filtros de 100 µm de diámetro (BD, San Diego, CA) y posteriormente se centrifuga esta suspensión a 1200 rpm. El precipitado celular se resuspende en buffer MACS (2mM EDTA y 0,5% BSA en PBS)

y se purifican las CDs mediante la utilización de un anticuerpo anti-CD11c acoplado a “bolitas magnéticas” (Miltenyi Biotech, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Generalmente se obtiene un enriquecimiento de un 98% de CDs. Las células se cultivaron en RPMI 10% FBS (Fetal Bovine Serum) a una concentración de 1×10^6 células/ml. La maduración de estas CDs se induce añadiendo LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) durante 24 horas (Aliberti et al. 2000; Ivankovic-Dikic et al. 2000).

3.2 Linfocitos CD4⁺ obtenidos a partir de ganglios y bazo de ratón.

Para la obtención de los linfocitos se extraen los ganglios y los bazos de los ratones y se disgregan en PBS 5 mM EDTA, empleando el émbolo de una jeringuilla. A continuación la suspensión celular se pasa a través de filtros de $100 \mu\text{m}$ de diámetro (BD, San Diego, CA), y posteriormente se centrifuga esta suspensión a 1200 rpm. El precipitado celular se resuspende en buffer MACS (2mM EDTA y 0,5% BSA en PBS) y se purifican los linfocitos mediante la utilización de un anticuerpo anti-CD4⁺ T cell acoplado a “bolitas magnéticas” (Miltenyi Biotech, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en RPMI 10% FBS (Fetal Bovine Serum) a una concentración de 1×10^6 células/ml.

4. Formación de sinapsis inmunológicas

La formación de sinapsis inmunológicas se indujo siguiendo los protocolos previamente establecidos (Maldonado R.A. et al. 2004; Al-Alwan M.M. et al, 2001). Dado que esta sinapsis se establece entre CDs y linfocitos CD4⁺ obtenidos de ratones OTII, es necesario incubar previamente las CDs con el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ ($10 \mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos a 37°C en medio RPMI sin suero. Una vez realizada esta incubación, las células se mezclan en una proporción 1 CD:5 linfocitos CD4⁺ en medio RPMI con 10% FCS y esta suspensión celular se centrifuga a 800 rpm durante 5 minutos en un tubo cónico para optimizar la interacción entre los dos tipos celulares. Por último se incuba a 37°C durante el tiempo establecido para cada experimento.

5. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La detección de las especies reactivas de oxígeno se llevó a cabo empleando las sondas dihidroetidina (DHE) y CellROX Green para la medición de anión superóxido (O_2^-).

Para ello, se indujo la formación de sinapsis y 30 minutos antes de detener el experimento se adiciona la sonda correspondiente a una concentración de $50 \mu\text{M}$,

dejando incubar en oscuridad a 37°C. En el caso de los puntos experimentales a tiempos cortos (15 minutos) las sondas se añaden al principio del experimento. Transcurrido este tiempo se fijaron las muestras en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y una vez fijadas se adhirieron sobre cubreobjetos recubiertos con poli-ornitina (20 µg/ml), incubándose 30 minutos a 37°C.

En el caso de las muestras teñidas con DHE una vez fijadas y adheridas sobre poli-ornitina, se permeabilizaron con metanol frío durante 10 minutos, se lavaron 2-3 veces con PBS y se tiñeron con Hoechst 33342 (5 µg/ml) en PBS 0.1% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último se lavaron las muestras 2 veces con PBS y se realizó un lavado final en agua destilada. Los cristales se montaron con medio de montaje Dako (Dakocytomation, Carpinteria, CA).

Las muestras analizadas se cuantificaron empleando el software Leica LAS AF Lite.

6. Análisis del potencial de membrana mitocondrial.

El análisis del potencial de membrana mitocondrial se realizó empleando el compuesto JC-1. Se trata de un compuesto con propiedades lipofílicas que tiene la capacidad de atravesar las membranas celulares. En las zonas con potenciales de membrana menos negativo permanece en su forma monomérica y proporciona una fluorescencia de color verde. Sin embargo, en la membrana mitocondrial interna de la mitocondria, donde existe un potencial de membrana muy negativo (aproximadamente –180 mV), el JC-1 forma agregados que emiten una fluorescencia roja. Estos agregados y formas monoméricas se visualizan empleando unas longitudes de onda de excitación/emisión de 488/585 y 488/522 nm respectivamente. El ratio entre la fluorescencia a 585 y 522 nm es el indicador de cambios en el potencial de membrana mitocondrial.

Para analizar este potencial de membrana se llevó a cabo la formación de sinapsis como se ha explicado anteriormente y se añadió el JC-1 a una concentración de 1 µM, incubando las células a 37°C durante 30 minutos. La señal del JC-1 se analizó tanto por citometría, midiendo el ratio de emisión 588/522, como por inmunofluorescencia.

7. Ensayos de apoptosis

Para los ensayos de apoptosis se llevó a cabo la formación de sinapsis en medio RPMI con ausencia de suero (que incluye factores de crecimiento, citoquinas y otros factores inductores de supervivencia). Para ello empleamos el mismo número de CDs viables de partida (determinado mediante exclusión de la tinción con Tripán Blue) y tras

el tiempo indicado de sinapsis en cada caso, se analizó la apoptosis mediante el método de tinción con Hoechst 33342.

Este método está basado en el hecho de que la morfología nuclear varía durante el proceso de apoptosis, produciéndose inicialmente su condensación y finalmente su fraccionamiento. La tinción con Hoechst 33342 permite detectar los cambios morfológicos del núcleo mediante inmunofluorescencia (Loo and Rillema 1998). Las células se fijaron con PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se colocaron sobre cubreobjetos recubiertos con poli-ornitina (20 µg/ml) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Tras esto se permeabilizaron con metanol frío durante 10 minutos, se lavaron 2-3 veces con PBS y se incubaron con una solución de Hoechst 33342 (5µg/ml) en PBS durante 1 hora. Finalmente se lavaron los cristales repetidas veces con PBS y agua destilada y se montaron con medio de montaje Dako (Dakocytomation, Carpinteria, CA).

8. Ensayos de proliferación de linfocitos T

El análisis de la proliferación de linfocitos T se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Quah B.J. y colaboradores (Quah, Warren et al. 2007). Se resuspendieron los linfocitos T a una concentración de 6×10^6 células/ml en PBS BSA 0.1%, y se tiñeron con CFSE a una concentración de 5 µM durante 30 minutos a 37°C. Una vez teñidos se realizaron varios lavados en PBS para eliminar el exceso de colorante y se llevó a cabo la formación de la sinapsis inmunológica. Transcurridas 24 h se analizaron los niveles de CFSE por citometría de flujo.

9. Western Blot

Las CDs (5×10^5 células por punto) se solubilizaron en tampón de carga 2×SDS-PAGE (200 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 mM sodio ortovanadato, 6% SDS, 1 mM EDTA, 4% β-mercaptoetanol, 10% glicerol y azul bromofenol).

Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Una vez bloqueadas las membranas en 5% de leche desnatada en TBST (TBS 0,1% Tween 20) pH 7.5, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (0,5 µg/ml) en TBST 5% BSA. Antes y después de incubar las membranas una hora con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:5000 en TBST, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) se realizaron 3 lavados sucesivos con TBST. Finalmente se revelaron las bandas inmunoreactivas con ECL (Pierce, Rockford, IL).

La densitometría de los *blots* se realizó con el software Multigauge de Fujifilm.

10. Citometría de flujo

Las células se analizaron en un citómetro de flujo EPICS (Coulter Electronics) equipado con un láser de Argón sintonizado a 488 nm capaz de procesar 6 señales simultáneas, 2 de dispersión y 4 de fluorescencia en el rango de 525 a 675 nm. La expresión de GFP y las tinciones con CFSE, se analizaron en el canal FL1 y para tinciones realizadas con PE empleamos el canal FL2. El análisis posterior se llevó a cabo con el programa CXP Analysis (Beckman Coulter).

11. Inmunocitoquímica

Las células se colocaron sobre cubreobjetos recubiertos con poli-ornitina (20 µg/ml) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. En aquellos casos en los que se quiso ver el LC3-GFP se realizó un lavado posterior con saponina al 0.05% en PBS. Posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 min a temperatura ambiente (TA) y se lavaron 3 veces con PBS. En el caso de experimentos en los cuales los tiempos son inferiores a 30 minutos, las células se fijaron directamente en suspensión y una vez fijadas se adhirieron sobre la poli-ornitina (Holdorf A.D. et al. 2002).

Tras la fijación se permeabilizaron con metanol frío durante 10 min, se lavaron 2-3 veces con PBS y se bloquearon con el anticuerpo anti-CD16/32 a una dilución 1/1000 en PBS 0.1% BSA durante 30 min a 4°C, para impedir las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos. Una vez bloqueadas las células se realizó la incubación con el anticuerpo primario en PBS 0,1% BSA, 1 hora a TA. Tras ello las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario junto con el Hoechst 33342 (5 µg/ml) en PBS 0.1% BSA durante 1 hora a TA.

En aquellos casos en los que el anticuerpo primario es de ratón, una vez permeabilizadas las células con metanol frío, se bloquearon e incubaron con el anticuerpo primario correspondiente empleando el kit Vector M.O.M Immunodetection Kit (Vector Laboratories). Como sistema de detección se usaron anticuerpos secundarios conjugados con estreptavidina.

Por último se lavaron las muestras 2 veces con PBS y se realizó un lavado final en agua destilada. Los cristales se montaron con medio de montaje Dako (Dakocytomation, Carpinteria, CA).

Los anticuerpos secundarios empleados fueron Alexa 568 anti-rabbit, Alexa 647 anti-guinea pig, Alexa 488 estreptavidina y Alexa 546 estreptavidina, todos ellos de Molecular Probes.

12. Microscopía de fluorescencia y confocal

El análisis de las muestras de inmunocitoquímica se realizó empleando un microscopio Axioplan Universal de Zeiss con una cámara CCD Digital Leica DFC 350 FX con un objetivo 63x ó 100x de inmersión en aceite (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Las imágenes de microscopía confocal se tomaron empleando un Microscopio Laser Confocal espectral (CLSM) Leica TCS SP2 equipado con 9 líneas de laser y sistemas AOTF y AOBS. El análisis de las imágenes se llevó a cabo usando el software Adobe Photoshop 7.0 (Adobe System Inc.).

La cuantificación que se realizó en algunas de las imágenes, se llevó a cabo empleando el Leica LAS AF Lite software.

13. Microscopía electrónica de transmisión

Las células se fijaron en glutaraldehído al 4% en PBS durante 30 min a 4°C. Tras esto se lavaron dos veces con PBS y se realizó una postfijación con ferrocianuro potásico al 3% en tampón fosfato y tetróxido de osmio al 1%. Una vez fijadas las células se deshidrataron gradualmente con concentraciones crecientes de etanol y se depositaron sobre rejillas de 75 mhs. Estas rejillas se tiñeron con acetato de uranilo al 5% y con citrato de plomo siguiendo el método Reynolds.

Las imágenes se tomaron empleando un microscopio electrónico JEOL modelo JEM-1230, y el posterior análisis de las mismas se llevó a cabo usando el software Adobe Photoshop 7.0 (Adobe System Inc.).

14. Análisis in vivo de la producción de ROS

Tras obtener las CDs de bazo de ratones C57BL/6 como se explicó anteriormente, éstas fueron teñidas con el colorante vital CFSE (5 μ M) durante 30 minutos a 37°C en PBS 0,1% BSA. La reacción se paró mediante la adición de medio completo y tras una centrifugación se resuspendieron las CDs teñidas a una concentración de 2×10^6 CDs/ 25 μ l RPMI con LPS (1 μ g/ml) y OVA (10 μ g/ml). Se realizaron inyecciones subcutáneas en las almohadillas plantares traseras de ratones C57BL/6, inyectándose 2×10^6 CDs en cada pata. Después de 18 horas, que es el tiempo necesario estimado para que las CDs inyectadas lleguen a los ganglios poplíteos, se inyectaron por vía intravenosa linfocitos OTII previamente teñidos con CMAC (20 μ M) durante 30 min a 37°C. Transcurridas 8 horas, tiempo estimado para la formación de sinapsis (Mempel T.R. et al 2004; Miller M.J. et al 2004), los animales fueron sacrificados y se extrajeron los ganglios poplíteos. Estos ganglios se incubaron durante 1 hora a 37°C en medio completo al que se adicionó DHE a una concentración de 50

µg/ml. Posteriormente se fijaron con PFA 4% durante 2 horas, se lavaron con PBS y se montaron entre dos cubreobjetos de vidrio con medio de montaje para muestras fluorescentes (Prolong Gold, Molecular Probes).

Las muestras se analizaron mediante microscopía multifotón. Las imágenes se tomaron con un objetivo 25x de inmersión en aceite en un microscopio confocal Leica invertido (TCS-SP2 AOBS spectral system) equipado con un láser de excitación de dos fotones (Ti:Zafiro, Mai Tai, Spectra-Physics). Los ganglios linfáticos fueron escaneados por ambos lados hasta una profundidad de 200-300 µm tomando imágenes cada 2 µm. El posterior análisis de las imágenes se realizó con el software de confocal de Leica (LCS, Leica Confocal Software).

15. Análisis estadístico

Los datos son representados como la media \pm SD (*Standard Deviation*) de los resultados obtenidos en ensayos valorados por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el test de la t de Student “no pareado”, considerando como significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. La formación de la sinapsis inmunológica induce la producción de ROS en la célula dendrítica.

Como primer objetivo de este trabajo quisimos estudiar si la formación de una sinapsis inmunológica (SI) entre un linfocito y una célula dendrítica (CD) alteraba los niveles de estrés oxidativo en la CD. Con este fin, obtuvimos CDs de bazo de ratones C57BL/6 y linfocitos T CD4 de ratones OTII (ver “Materiales y Métodos”), y posteriormente indujimos la formación de SI entre las dos células (ver “Materiales y Métodos”). Para el análisis de los niveles de ROS presentes en la CD 15 y 30 minutos tras la formación de la sinapsis, adicionamos al medio las sondas dihidroetidina (DHE) o CellROX (ver “Materiales y Métodos”), dos agentes no fluorescentes y con la capacidad de atravesar las membranas celulares, que tras ser oxidados, emiten una fluorescencia roja o verde respectivamente (Bucana, Saiki et al. 1986; Robinson, Janes et al. 2006).

Dado que las muestras se iban a analizar por inmunofluorescencia y que teníamos que analizar dos tipos celulares diferentes, era imprescindible teñir diferencialmente las células. Por este motivo teñimos los linfocitos antes de la formación de las sinapsis con el colorante vital CFSE (verde), en el caso de los experimentos en los que se empleó la sonda DHE, o con el colorante vital CMTMR (rojo), para los experimentos donde se usó CellROX. Transcurrido el tiempo del experimento, los conjugados se fijaron con PFA durante 15 minutos y posteriormente las células se adherieron sobre poli-ornitina y se permeabilizaron durante 10 minutos con metanol (ver “Materiales y Métodos”), para su posterior análisis y cuantificación mediante microscopía confocal.

Cuando comparamos la fluorescencia producida por las sondas DHE y CellROX en las CDs que se encontraban solas y en las CDs que se encontraban formando sinapsis, pudimos comprobar que éstas últimas mostraban una producción de ROS significativamente mayor que las células que no formaban sinapsis, las cuales presentaban una fluorescencia bastante inferior (Figura 1).

Quisimos comprobar si este comportamiento se reproducía de la misma manera *in vivo* en el ganglio linfático. Para ello inyectamos CDs extraídas de bazo de ratones C57BL/6 y marcadas con el colorante vital CFSE (CD-CFSE), en las almohadillas plantares de ratones aceptores de la misma cepa, C57BL/6. Tras las 18 horas necesarias para que las CDs lleguen a los ganglios (Mempel, Henrickson et al. 2004; Riolf-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009) les inyectamos de forma intravenosa (i.v.) linfocitos extraídos de ratones OTII marcados con el colorante vital CMAC (OTII-CMAC).

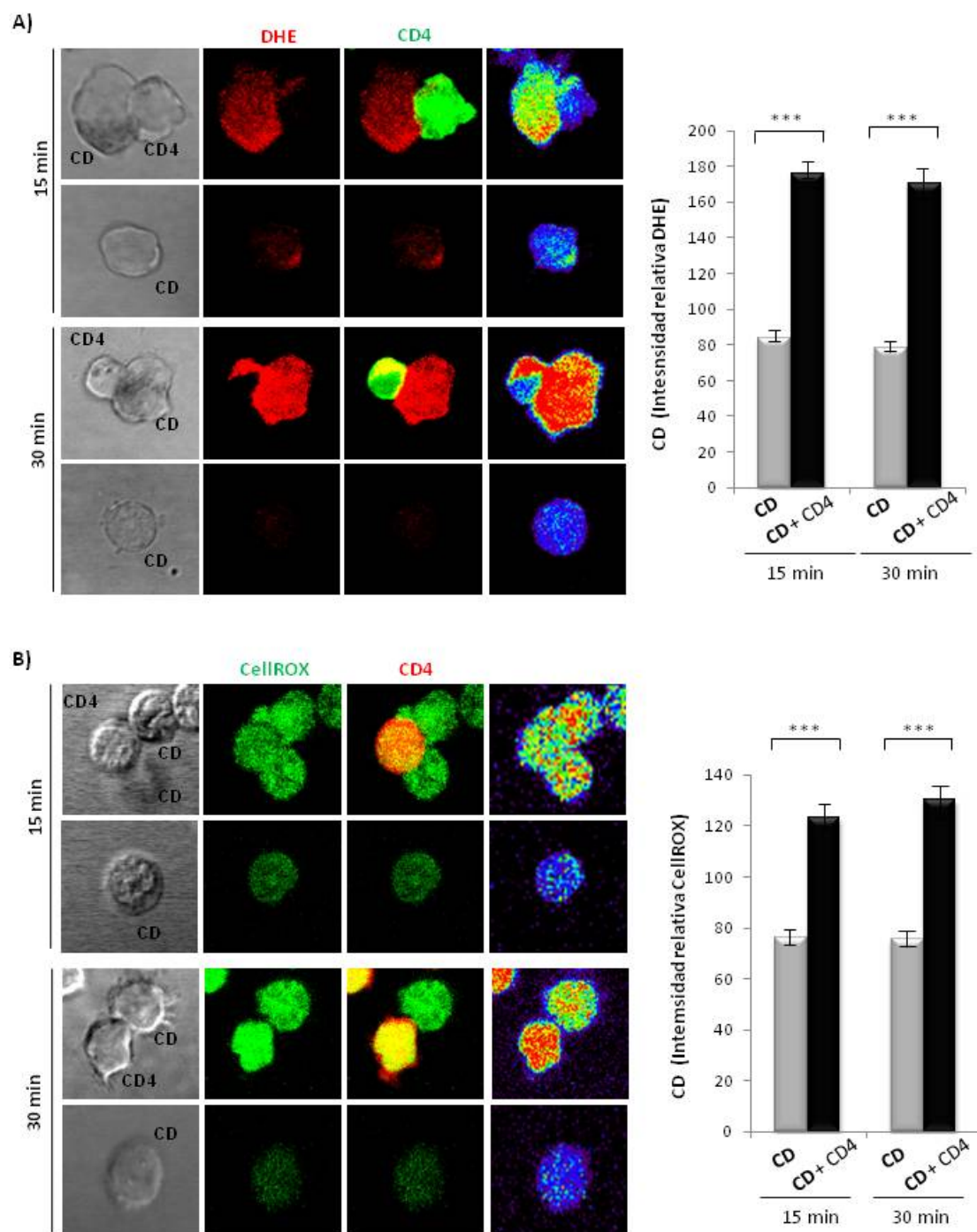


Figura 1. La SI produce un incremento de los niveles de ROS en las CDs. Las CDs fueron incubadas en una proporción 1:5 junto con linfocitos T CD4 para la formación de SI durante 15 o 30 minutos, adicionándose al medio (A) DHE o (B) CellROX, dos sondas capaces de detectar la producción de superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Se analizaron las muestras por microscopía confocal y se cuantificó la intensidad de fluorescencia para cada una de las dos sondas. Se muestran imágenes representativas de cada una de las tinciones y en las gráficas se representa la media de la intensidad relativa de fluorescencia \pm SD. *** $p \leq 0.0001$.

Al cabo de 8 horas, tiempo al cual se detecta la formación de contactos estables entre ambas células (Mempel, Henrickson et al. 2004; Miller, Safrina et al. 2004), se

extrajeron los ganglios poplíteos y se incubaron durante 1 hora en medio completo junto con DHE. Una vez teñidos, se fijaron en PFA durante 2 horas a 4°C, y tras el procesamiento, los ganglios se analizaron mediante microscopía multifotón. Como se observa en la Figura 2, comprobamos que al igual que ocurre *in vitro*, la formación de SI *in vivo* produce un incremento de los niveles de ROS en la CD (Figura 2).

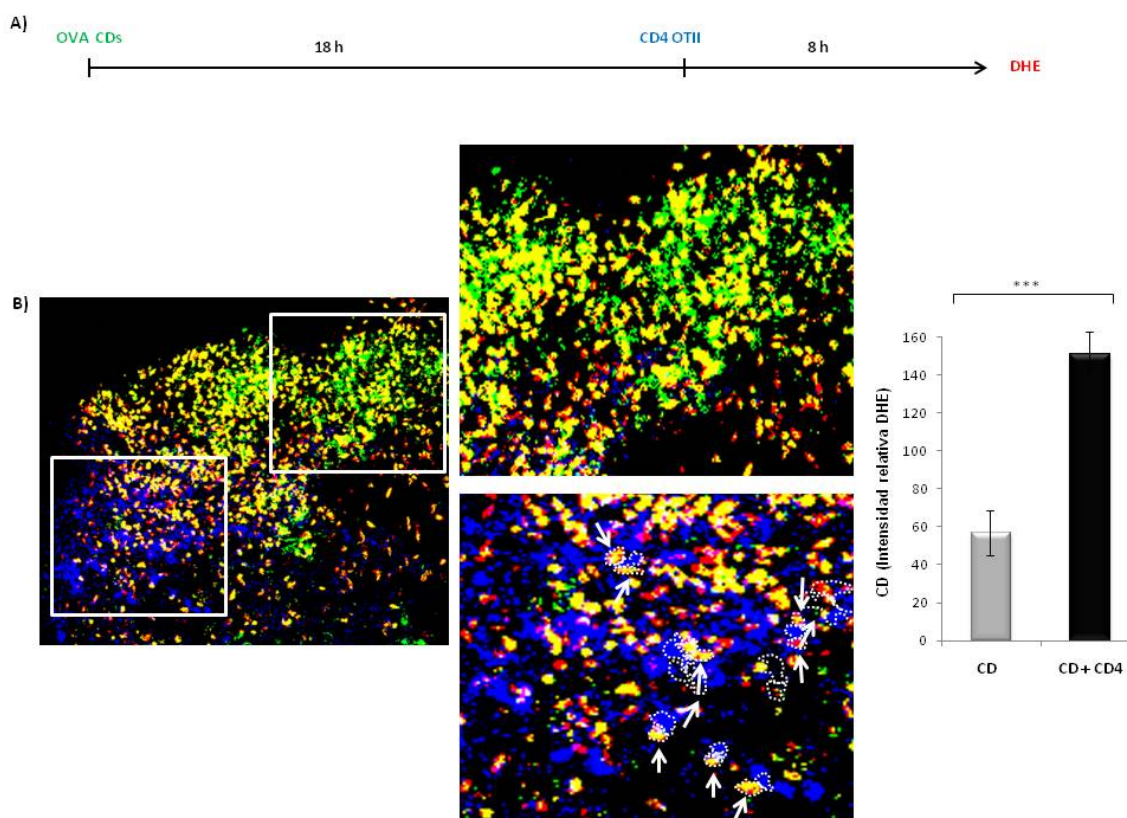


Figura 2. La SI desencadena un aumento en los niveles de ROS en las CDs *in vivo*. A) Explicación del procedimiento de medición de los niveles de ROS *in vivo*. Inyectamos por vía subcutánea (s.c.) y en presencia de LPS, CDs marcadas con CFSE (verde) en las almohadillas plantares de ratones aceptores. 18 horas más tarde inyectamos de manera intravenosa (i.v) linfocitos T CD4 marcados con CMAC (azul). Tras 8 horas los animales fueron sacrificados y se extrajeron los ganglios poplíteos, los cuales se tiñeron durante una hora en una solución 50 μ M de DHE (rojo). B) Análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía multifotón. A la izquierda se muestra una región amplia de una sección del ganglio poplíteo. A la derecha se muestran en más detalle dos regiones de interés, la superior, una zona donde no hay linfocitos T, y la inferior, la región donde se disponen los linfocitos T y por tanto, donde tiene lugar la SI. En verde se ven los linfocitos que tienen bajos niveles de ROS y en amarillo los que presentan altos niveles.

En conclusión, nuestros resultados indican que la formación de la SI da lugar a un incremento en la producción de radicales libres (ROS) en el interior de la CD, tanto *in vitro* como *in vivo*.

2. La mitocondria es la principal fuente de ROS en la célula dendrítica durante la sinapsis inmunológica.

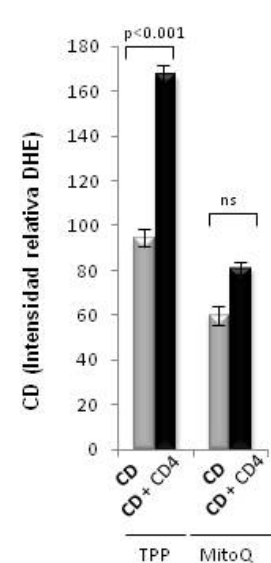
Se encuentra ampliamente descrito que la mitocondria es una de las principales fuentes de ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en la célula, el cual se origina en los complejos I, II y III de la cadena de transporte de electrones, debido al “escape” de electrones que reducen el oxígeno a $O_2^{\cdot-}$ (Turrens 2003; Murphy 2009). El $O_2^{\cdot-}$ producido en los complejos I y II se libera a la matriz mitocondrial donde se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de la superóxido dismutasa 2 (SOD2), mientras que el $O_2^{\cdot-}$ producido en el complejo III se libera tanto a la matriz como al espacio intermembrana de la mitocondria, pudiendo este último acceder al citoplasma a través de canales dependientes de voltaje, sin necesidad de transformarse en H_2O_2 (Han, Antunes et al. 2003; Muller, Liu et al. 2004; Murphy 2009).

Para comprobar si los ROS producidos en la CD a consecuencia de la formación de la SI (Figura 1 y Figura 2) tenían su origen en la mitocondria, empleamos Mitoquinona (MitoQ), un inhibidor específico de la cadena de transporte de electrones (Asin-Cayuela, Manas et al. 2004), que bloquea selectivamente la formación de ROS mitocondriales. El MitoQ es un antioxidante mitocondrial selectivo que ha sido usado ampliamente para modular la producción de ROS en la mitocondria al bloquear el sistema ubiquinol del complejo III mitocondrial, disminuyendo así la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Kelso, Porteous et al. 2001; Cocheme, Kelso et al. 2007; Smith and Murphy 2010).

Para llevar a cabo estos experimentos realizamos un pretratamiento de las CDs con MitoQ o su control negativo, TPP, durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se lavaron las células y se indujo la formación de sinapsis durante 30 min, en presencia de DHE o CellROX para la posterior detección de los niveles de ROS. Dado que las muestras se iban a analizar por inmunofluorescencia al igual que en los experimentos anteriores, los linfocitos fueron marcados con CFSE ó CMTMR antes de ponerlos junto con las CDs para la formación de la SI.

El análisis de las muestras reveló que el incremento de ROS inducido por la formación de la SI se ve inhibido en las CDs que habían sido previamente tratadas con MitoQ, pero no en aquellas que habían sido tratadas con el control TPP (Figura 3). Los resultados confirman que la mitocondria es una importante fuente de ROS en la CD durante la formación de la SI.

Estudios previos realizados en los linfocitos T mostraban que durante la formación de la SI las mitocondrias se redistribuyen en las proximidades de la zona de contacto entre las dos células (Quintana, Schwindling et al. 2007; Contento, Campello et al. 2010; Baixauli, Martin-Cofreces et al. 2011). Por este motivo, y dado que nuestros resultados indicaban que la formación de la SI produce un notable incremento de ROS mitocondriales en la CD, quisimos comprobar si esta redistribución de la mitocondria desencadenada por la formación de la SI tenía lugar también en la CD.



Para analizar la distribución de las mitocondrias empleamos dos metodologías diferentes. En primer lugar, observamos las células mediante microscopía electrónica,

para lo cual llevamos a cabo la formación de la SI y transcurridos 30 minutos fijamos las células en glutaraldehído. Una vez fijadas se procedió a realizar una post-fijación y se tiñeron siguiendo el método Reynolds como se indica en “Material y Métodos”.

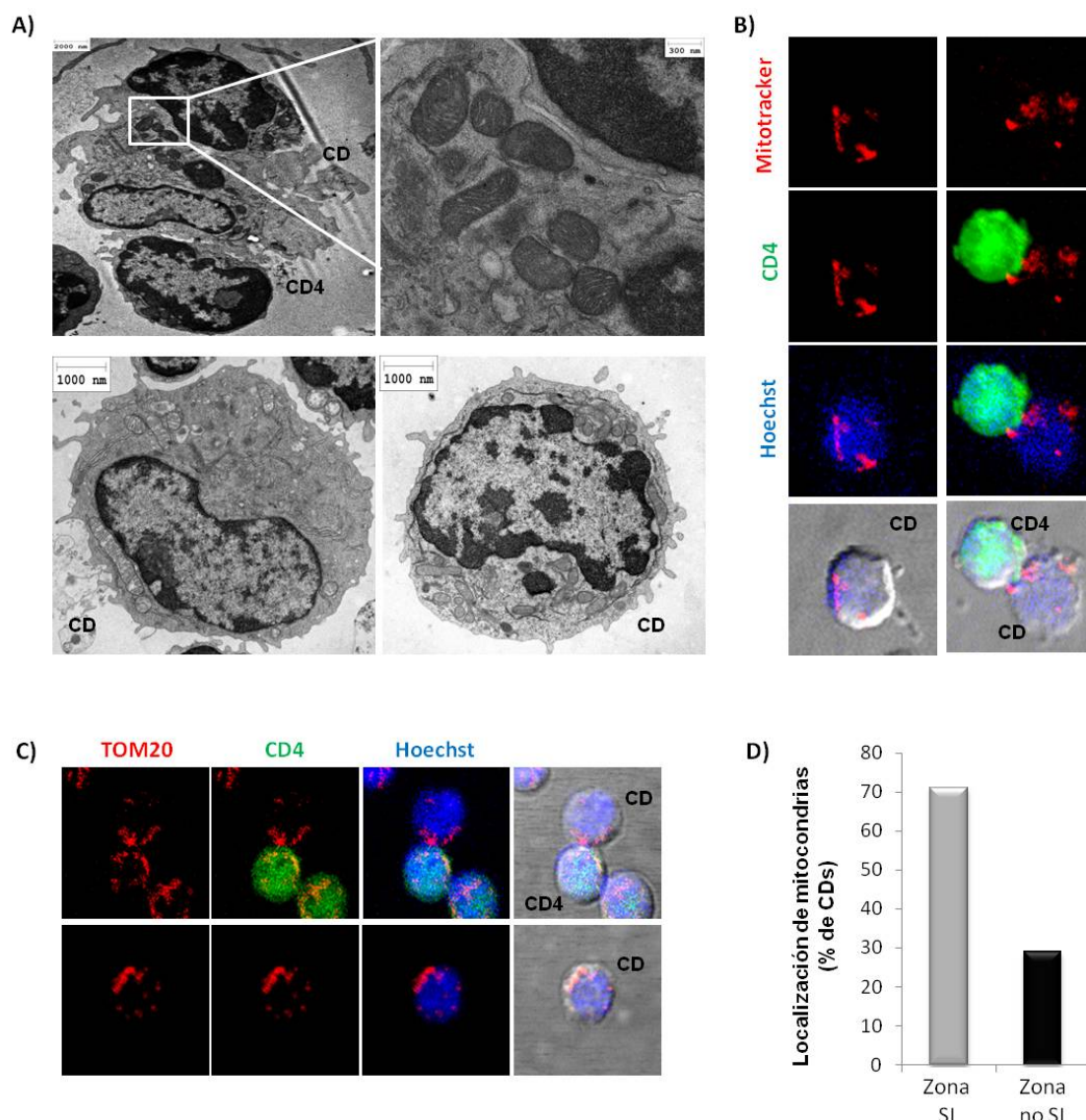


Figura 4. Durante la SI las mitocondrias de la CD se disponen en las proximidades de la zona de contacto con el linfocito T. A) La SI se analizó mediante microscopía electrónica para estudiar la localización de las mitocondrias. B) Se pretrataron las CDs con Mitotracker (300 nM) durante 30 minutos y se llevó a cabo la formación de SI con linfocitos previamente teñidos con CFSE. Las muestras se fijaron, se adhirieron sobre cristales recubiertos con poli-oritina y se analizaron mediante microscopía confocal. C) Se indujo la formación de SI y transcurridos 30 minutos las muestras se fijaron y se adhirieron sobre cristales recubiertos con poli-oritina, realizándose una inmunofluorescencia con el anticuerpo TOM20. Posteriormente se analizaron las SI por microscopía confocal. D) Se cuantificó la localización de las mitocondrias en la CD en función de su disposición próxima o no a la zona de contacto con el linfocito T.

En segundo lugar, analizamos las células por microscopía confocal mediante el empleo del marcador MitoTracker, un colorante mitocondrial específico con capacidad para atravesar las membranas celulares. En este caso se pretrataron las CDs con

MitoTracker durante 30 minutos a 37°C, se lavaron para eliminar el exceso de colorante, y se procedió a la inducción de la formación de la SI. Aunque este pretratamiento nos proporcionaba la ventaja de poder marcar exclusivamente las mitocondrias presentes en las CDs, teñimos los linfocitos con CFSE antes de la formación de sinapsis. El análisis de ambas microscopías confirmó que tras la formación de la SI, se produce una redistribución de las mitocondrias presentes en la CD, hacia las proximidades de la zona de contacto con el linfocito T (Figura 4A y 4B).

Con el fin de complementar estos resultados analizamos también mediante inmunofluorescencia la localización de las mitocondrias en las CDs, empleando el marcador mitocondrial TOM20, presente en la membrana mitocondrial externa. Para ello se procedió a la inducción de SI y transcurridos 30 minutos las muestras se fijaron como se indica en “Material y Métodos”. Posteriormente, se adhirieron sobre cubreobjetos recubiertos con poli-ornitina y se llevó a cabo la tinción de TOM20 (ver “Material y Métodos”). El resultado nos permitió confirmar, que las mitocondrias de la CD se encuentran localizadas en las proximidades de la zona de contacto con el linfocito T en al menos el 70% de las SI analizadas (Figura 4C y 4D).

Diversos estudios han demostrado que los ROS pueden producir un daño oxidativo en la mitocondria (Lee, Giordano et al. 2012), y este daño puede dar lugar a una despolarización o pérdida del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), como consecuencia de la apertura de poros de permeabilidad transitoria (MPTP, *Mitochondrial permeability transition pore*) presentes en dicha membrana. La apertura de estos MPTPs desencadena una permeabilización de la membrana interna de la mitocondria, que causa la despolarización de la misma a consecuencia de la disipación del gradiente electroquímico, con la consiguiente alteración en la síntesis de ATP (Gottlieb and Carreira 2010; Smith, Hartley et al. 2012; Wang, Nartiss et al. 2012).

Basándonos en estos conocimientos previos y dado que veíamos un notable incremento de los niveles de ROS mitocondriales en las CDs tras la formación de la SI, quisimos analizar el posible daño oxidativo que esos ROS causaban en las mitocondrias de dichas células. Para ello llevamos a cabo la formación de SI y añadimos a las células la sonda JC-1, un colorante catiónico capaz de incorporarse selectivamente a las mitocondrias y que presenta la capacidad de cambiar su emisión de color de rojo (λ_{588}) a verde (λ_{522}) a medida que disminuye el $\Delta\psi_m$ (ver “Material y Métodos”). Como control positivo, parte de las CDs se trataron previamente con CCCP, un desacoplante de la cadena de transporte mitocondrial capaz de disipar rápidamente el gradiente de protones, disminuyendo así el potencial de membrana. Las células se incubaron durante 30 minutos con JC-1 a 37°C y a continuación se analizó la emisión producida por el JC-1 mediante inmunofluorescencia.

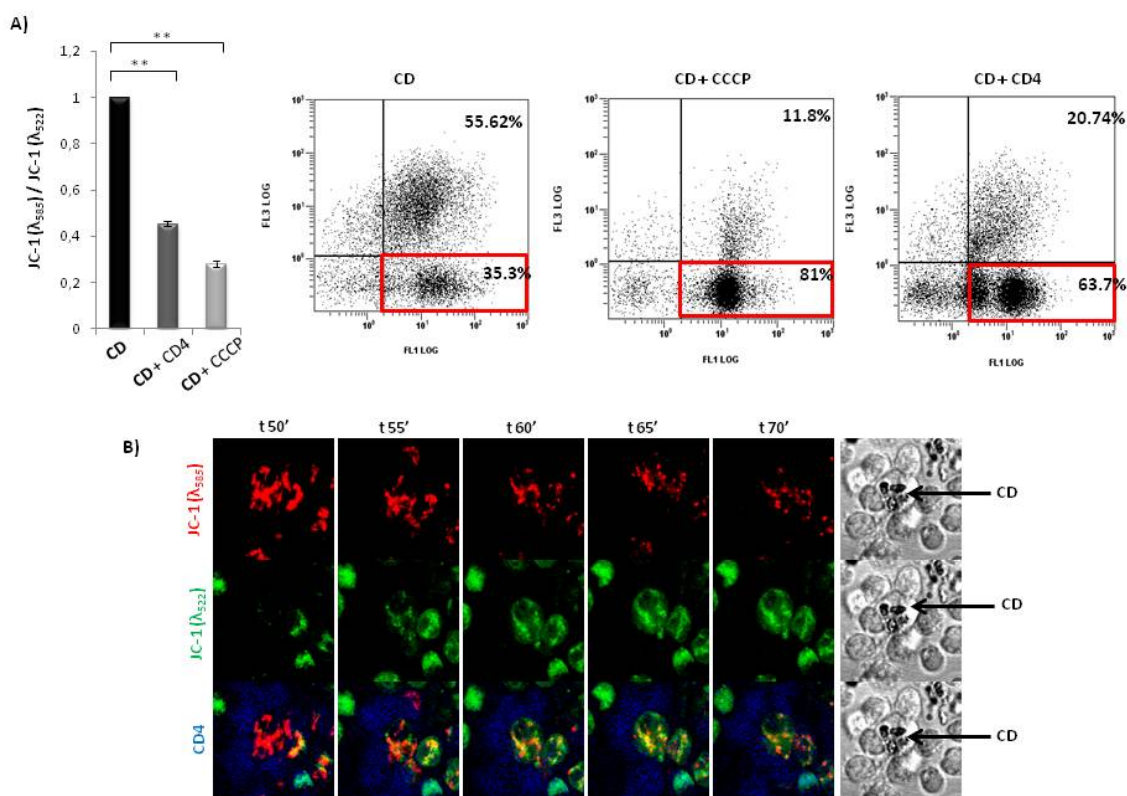


Figura 5. Los ROS producidos a consecuencia de la formación de la SI, inducen despolarización mitocondrial en la CD. Se analizó el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) mediante el empleo de la sonda JC-1. Se indujo la formación de SI y se añadió al medio JC-1 a una concentración de 50 μM durante 30 minutos. Como control positivo del experimento se utilizó CCCP (50 μM , 30 min), un desacoplante de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. A) Se analizaron las muestras por citometría para cuantificar el grado de despolarización mitocondrial transcurridos 30 minutos de la formación de la SI. Se muestra el ratio entre la emisión de fluorescencia a λ_{588} y la emisión a λ_{522} . ** $p \leq 0.001$. B) Se observó el comportamiento mitocondrial por microscopía confocal. A los 30 minutos de iniciarse la formación de SI se adhirieron las células sobre poli-ortinina y se tomaron imágenes por microscopía confocal cada 5 minutos.

Como se observa en la figura 5B, tras 30 minutos de incubación con JC-1 solamente las CDs presentan fluorescencia derivada del JC-1, no siendo así en el caso de los linfocitos T, lo cual permite analizar a estos tiempos la fluorescencia causada por el JC-1 sólo en las CDs. Estas imágenes indican además, la existencia de un daño mitocondrial en la CD, ya que se puede ver cómo a medida que pasa el tiempo se va produciendo un cambio en la coloración de las mitocondrias, las cuales pasan de rojo (mayor $\Delta\psi_m$) a verde (menor $\Delta\psi_m$). Con el fin de corroborar estos datos y poder cuantificar en qué medida se veía afectado el $\Delta\psi_m$, llevamos a cabo el mismo experimento descrito anteriormente y analizamos las muestras mediante citometría de flujo midiendo el ratio de emisión $\lambda_{588}/\lambda_{522}$. Este análisis nos permitió comprobar que

tras la formación de la SI, al menos el 60% de las CDs presenta algunas de sus mitocondrias despolarizadas (Figura 5A).

En conjunto, estos resultados indican que la formación de la SI induce una redistribución de las mitocondrias presentes en la CD hacia la zona de contacto con el linfocito T, siendo estos orgánulos una de las principales fuente productoras de ROS en la CD. Estos ROS además, provocan una despolarización de la membrana de la mitocondria con el consiguiente daño mitocondrial.

3. La sinapsis inmunológica induce autofagia independiente de mTORC1 en la célula dendrítica.

La integridad de la mitocondria es fundamental para la homeostasis celular, existiendo en la célula mecanismos que permiten eliminar las mitocondrias dañadas, de forma que se asegure una eficiente producción de energía y se evite la liberación de moléculas inductoras de apoptosis como el citocromo c, o un incremento excesivo en la producción de ROS (Gottlieb and Carreira 2010; May, Devenish et al. 2012). Estudios previos indican que el daño causado por despolarización mitocondrial es capaz de inducir la activación de la autofagia como mecanismo de eliminación de mitocondrias dañadas (Lemasters 2005; Youle and Narendra 2011; Kurihara, Kanki et al. 2012), por lo que decidimos analizar si este proceso tenía lugar también en las CDs tras la formación de la SI.

Para el estudio de la autofagia empleamos CDs obtenidas de ratones transgénicos GFP-LC3 C57BL/6 (Mizushima, Yamamoto et al. 2004). Como se ha comentado en la introducción, durante el proceso autofágico el LC3-I es conjugado con fosfatidiletanolamina (PE), dando lugar a la forma LC3-PE, denominado también LC3-II, nombre con el que se menciona en adelante. Los niveles de LC3-II son el marcador más fiable del proceso autofágico que se ha descrito hasta la fecha, ya que esta proteína permanece asociada al autofagosoma completo, reflejando la abundancia de estas estructuras en la célula (Mizushima 2004).

Con el fin de asegurar una medida real del flujo autofágico en las células y no cambios en la tasa de degradación del LC3-II debido a la acción de las proteasas lisosomales, estos experimentos se llevaron a cabo en presencia de los inhibidores de proteasas E-64d y pepstatina, los cuales impiden la degradación lisosomal de los autofagosomas.

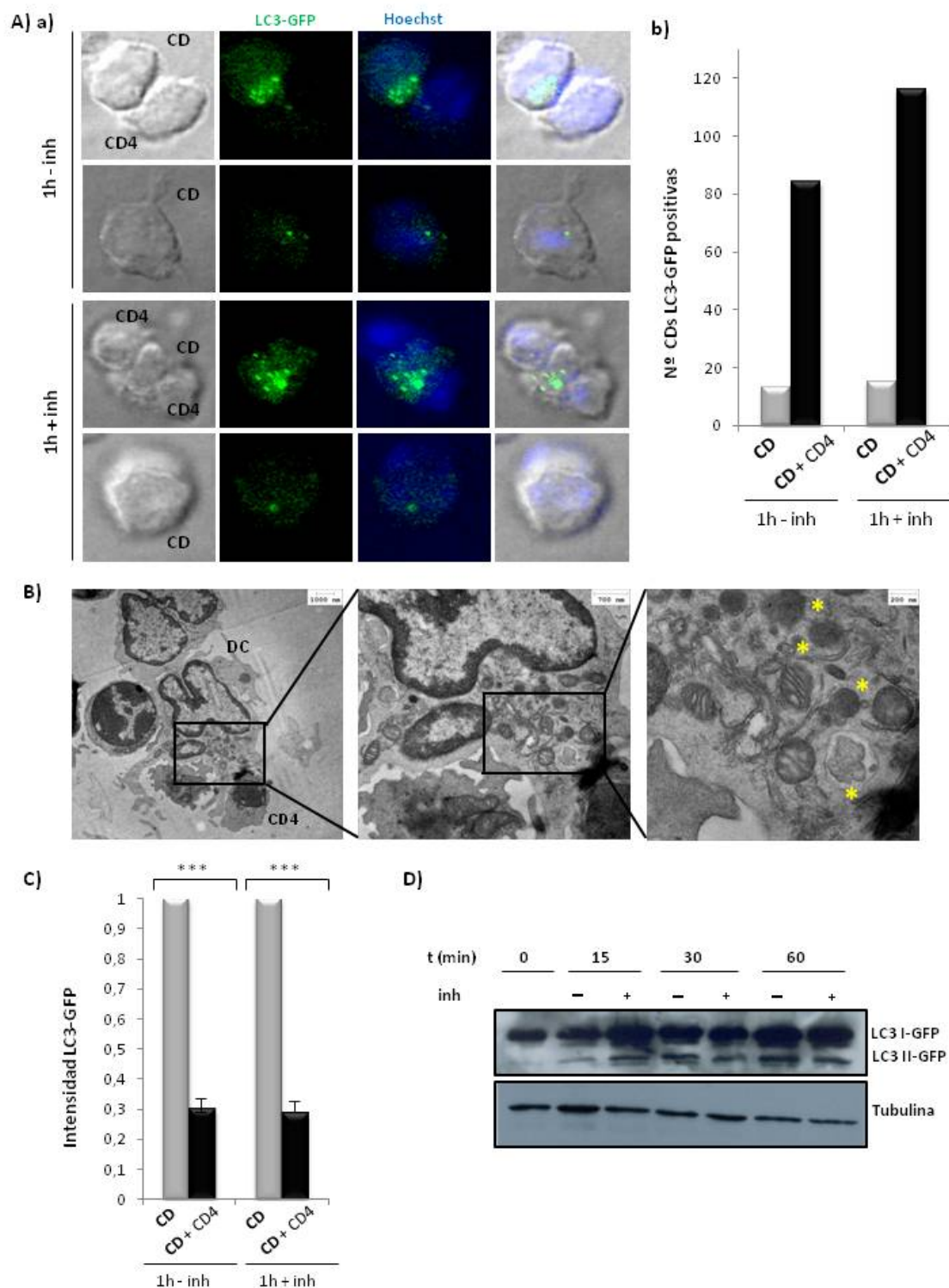


Figura 6. La formación de la SI induce la activación de la autofagia en la CD. Para el estudio de la autofagia se emplearon CDs procedentes de ratones transgénicos LC3-GFP, lo que nos permitía estudiar los niveles de autofagia exclusivamente en la CD. Se analizó la autofagia mediante distintos métodos. A) (a) Se indujo la formación de SI en presencia o ausencia de E-64d y pepstatina y se analizaron las muestras usando microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas (b) Basándonos en las imágenes obtenidas, se cuantificó el número de células LC3II-GFP positivas, en presencia o ausencia de inhibidores. B) Mediante microscopía electrónica se comprobó la presencia de autofagosomas y su localización dentro de la CD durante la formación de la SI. C) Tras la inducción de SI se analizaron los niveles de LC3II-GFP en la CD mediante citometría. En la gráfica se representa la intensidad media del

LC3II-GFP \pm SD. *** $p \leq 0.0001$. D) Se estudiaron por *Western Blot* los niveles de LC3II-GFP a diferentes tiempos tras la formación de la SI, tanto en presencia como en ausencia de E-64d y pepstatina.

Una vez extraídas las CDs de los ratones GFP-LC3 C57BL/6, se llevó a cabo la formación de SI en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas. Transcurridos 60 minutos los conjugados se adhirieron sobre cubreobjetos recubiertos con poli-ornitina y se realizó un lavado con saponina al 0.05% en PBS para eliminar el LC3-I, el cual no se encuentra asociado a los autofagosomas. Posteriormente, se fijaron las células con PFA y se tiñeron con Hoechst. El análisis de las muestras mediante inmunofluorescencia nos permitió observar la presencia de *puncta* LC3II-GFP en las CDs, confirmando una mayor abundancia de los mismos en aquellas CDs que se encuentran formando SI respecto a las CDs que se encuentran solas (Figura 6A(a) y (b)). Resulta de interés que estos *puncta* de LC3II-GFP, se observan en la proximidad de la zona de contacto entre la CD y el linfocito, lo que indica que la autofagia tiene lugar selectivamente en esta región (Figura 6A(a)). Con el fin de complementar estas observaciones quisimos visualizar las CDs mediante microscopía electrónica (ver “Material y Métodos”) para poder analizar la presencia de los autofagosomas y su localización dentro de la CD. El análisis de estas imágenes corrobora la presencia de autofagosomas en el interior de la CD en las proximidades de la zona de contacto con el linfocito, y el incremento de los mismos en comparación con aquellas CDs que no se encuentran formando SI (Figura 6B).

Para confirmar estos resultados realizamos en primer lugar una cuantificación de los niveles de LC3II-GFP mediante citometría siguiendo los protocolos establecidos (Shvets and Elazar 2009; Eng, Panas et al. 2010). Este método permite cuantificar la autofagia midiendo la liberación de LC3II-GFP en los lisosomas ya que la molécula de GFP es sensible a bajos pH, por lo que su fluorescencia desaparece inmediatamente tras su incorporación al interior del lisosoma. La disminución en la fluorescencia que observamos, nos permitió comprobar que la SI produce un aumento en los niveles de autofagia de la CD (Figura 6C). Estudiamos también la inducción de la autofagia tras la formación de la SI mediante *Western Blot*, para lo cual analizamos los niveles de LC3II-GFP a diferentes tiempos tras la formación de la SI. Los resultados confirman una vez más, que se produce un aumento en los niveles de LC3-II tras la formación de la SI, y que este incremento tiene lugar tan solo 15 minutos después de la formación de la misma (Figura 6D).

Está ampliamente descrito que la privación de nutrientes constituye un potente estímulo inductor de autofagia tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, siendo capaz de inducir autofagia como mecanismo de supervivencia celular en cuestión de minutos (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005; Mizushima, Yoshimori et al. 2010). Quisimos analizar cómo de potente era la SI como inductora de autofagia en las CDs, en comparación con la autofagia que induce la privación de nutrientes. Para ello empleamos CDs GFP-LC3 y llevamos a cabo la formación de SI durante 60 minutos en presencia o ausencia de glucosa en el medio. Como se puede ver en la Figura 7, el

análisis de las muestras reveló que el incremento en los niveles de LC3II-GFP inducido por la SI en las CDs es mayor que el observado cuando las CDs son privadas de glucosa, lo que indica que la SI es un potente inductor de autofagia en las CDs.

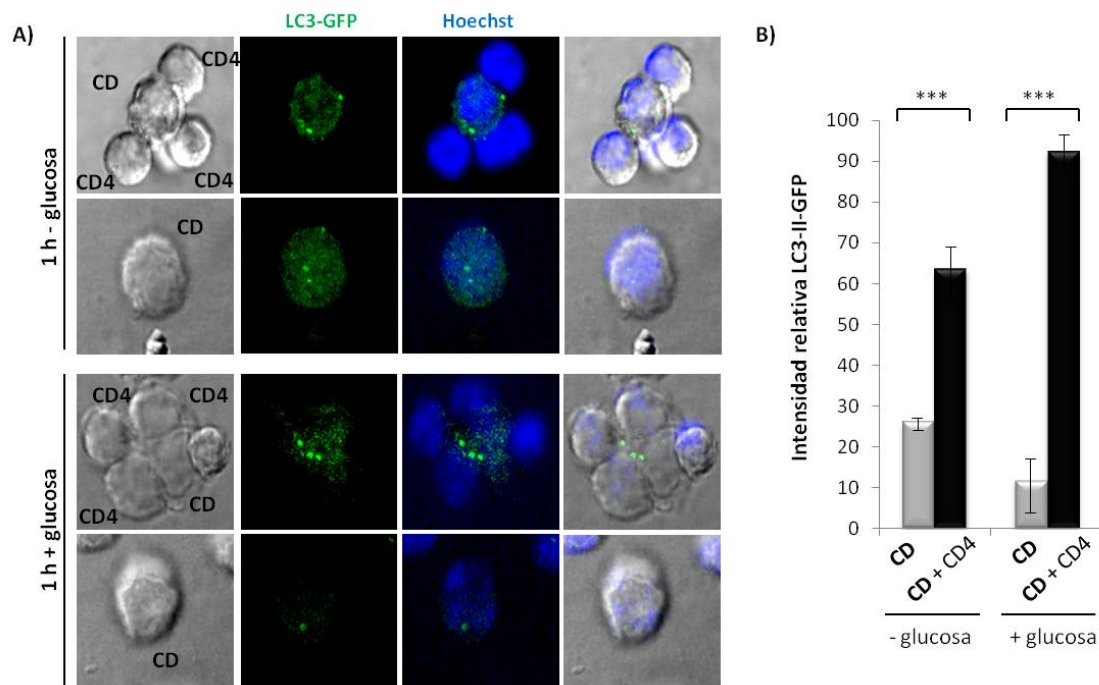


Figura 7. El efecto sobre la inducción de la autofagia ejercido por la SI es más potente que el ejercido por la ausencia de glucosa en el medio. Se llevó a cabo la formación de SI con CDs GFP-LC3 en presencia o ausencia de glucosa en el medio, y se analizaron las muestras por microscopía confocal (A), cuantificándose también la intensidad del LC3II-GFP en cada uno de los casos (B). En la gráfica se representa la intensidad relativa del LC3II-GFP \pm SD. *** $p \leq 0.0001$.

Para complementar estos resultados analizamos mediante inmunofluorescencia la presencia en las CDs de diferentes marcadores de autofagia, como Beclina1, presente en el complejo que controla la curvatura de la membrana de los autofagosomas (Funderburk, Wang et al. 2010; Kang, Zeh et al. 2011), y Atg5 y Atg12, implicados en la elongación de la membrana del autofagosoma (Simonsen and Tooze 2009). Para ello, se procedió a la inducción de la formación de la SI y transcurridos 60 minutos se fijaron las muestras, se adhirieron sobre cubreobjetos recubiertos con poli-ornitina y se llevó a cabo la tinción con los anticuerpos indicados. El análisis de las imágenes nos permitió confirmar la presencia de marcadores de autofagia en aquellas CDs que se encuentran formando SI, así como también una localización de los mismos próxima a la zona de contacto entre la CD y el linfocito (Figura 8A).

Estudios previos han demostrado que la pérdida del $\Delta\psi_m$ desencadena la activación de mitofagia por la vía PINK1/Parkin (Matsuda, Sato et al. 2010; Vives-Bauza, Zhou et al. 2010; Wang, Nartiss et al. 2012), produciéndose una acumulación de

PINK1 en la membrana externa mitocondrial y el consiguiente reclutamiento de la ubiquitina ligasa Parkin, que marca las mitocondrias dañadas mediante ubiquitinación para su posterior degradación. Dado que la integridad mitocondrial se encuentra alterada por una disminución del $\Delta\psi_m$, y que se está produciendo un aumento en los niveles de autofagia a consecuencia de la formación de la SI, analizamos si PINK1 y Parkin localizaban en la zona de la SI en la CD, lo cual indicaría que la mitofagia es activa en esta región. Tras la inducción de la SI se analizó a los 30 y 60 minutos la presencia de estos dos marcadores en las CDs mediante inmunofluorescencia. Como se observa en la Figura 8B se observa que PINK1 se expresa en las CDs de manera muy tenue a los 30 minutos y con más intensidad pasados 60 minutos tras la formación de la SI. En el caso de Parkin sólo se observa tinción a los 60 minutos.

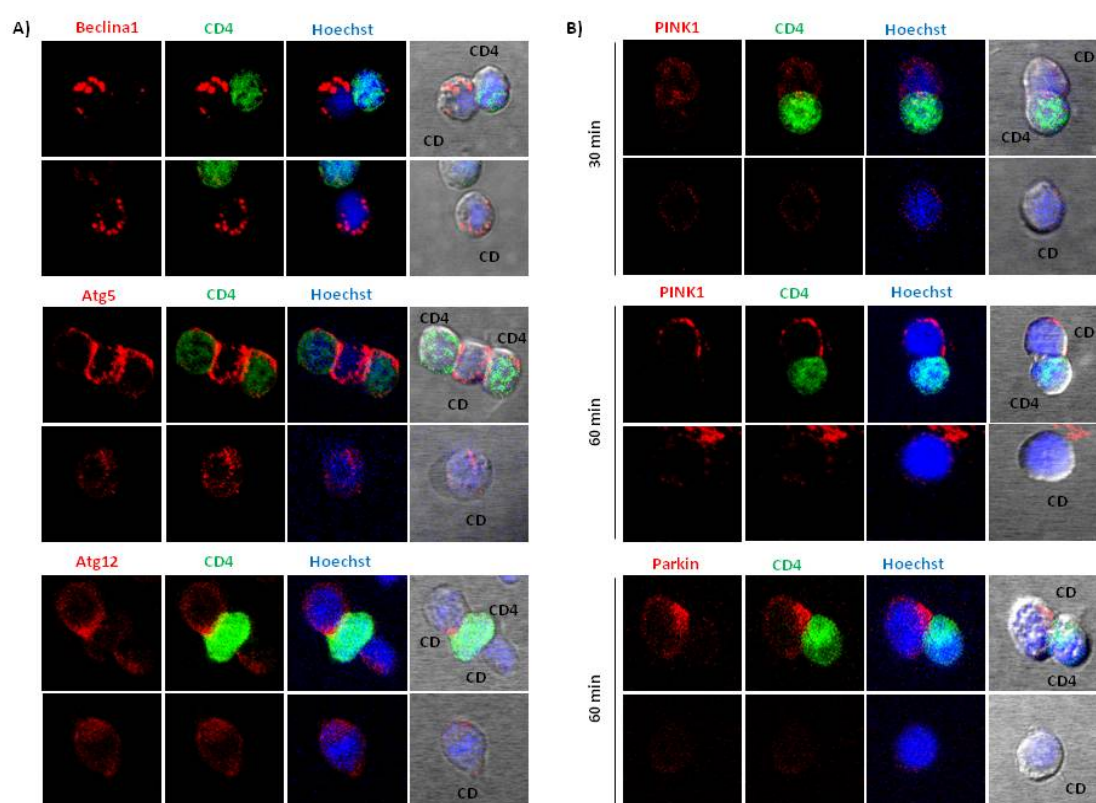


Figura 8. La SI induce la acumulación de marcadores de autofagia/mitofagia en la CD. Se llevó a cabo la formación de SI y transcurridos 30 ó 60 minutos, se fijaron las células, se adhirieron sobre cubreobjetos recubiertos con poli-ornitina y se realizó la tinción correspondiente, analizándose las muestras mediante microscopía confocal. A) Se estudió la presencia en la CD de los marcadores de autofagia Beclina1, Atg5 y Atg12. B) Se determinó la aparición de los marcadores de mitofagia PINK1 y Parkin en la CD.

Los mecanismos que regulan la activación de la autofagia han sido ampliamente estudiados y tienen como controlador central a mTORC1, un complejo protéico serina/treonina quinasa capaz de inhibir la autofagia al hiperfosforilar Atg13, lo que

impide su asociación con Atg1 y bloquea la formación del autofagosoma (Lee, Kim et al. 2007; Jung, Jun et al. 2009). En nuestro laboratorio se ha descrito además, que la formación de la SI induce la activación de Akt, una quinasa que activa mTORC1 (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009), por lo que estos datos se contradecían con nuestros resultados experimentales hasta ese momento. Sin embargo, durante el desarrollo de esta tesis se publicó un trabajo del doctor J. Yuan y colaboradores, donde demuestran la existencia de rutas autofágicas independientes de mTORC1 (Lipinski, Hoffman et al. 2010).

Por este motivo quisimos corroborar que la SI en nuestras condiciones experimentales es capaz de inducir en las CDs una autofagia independiente de mTORC1. Para ello, llevamos a cabo la formación de SI y analizamos mediante inmunofluorescencia la activación de mTORC1, empleando como marcador de dicha actividad la fosforilación y consiguiente activación de la S6-quinasa (S6K), un sustrato directo de mTORC1. Como se observa en la Figura 9, S6K se encuentra fosforilada en aquellas CDs que están formando SI pero en mucho menor grado en las que se encuentran solas. Este resultado indica por tanto, que tras la formación de la SI, mTORC1 se encuentra activo y que la SI es capaz de inducir autofagia en la CD mediante un mecanismo independiente de mTORC1.

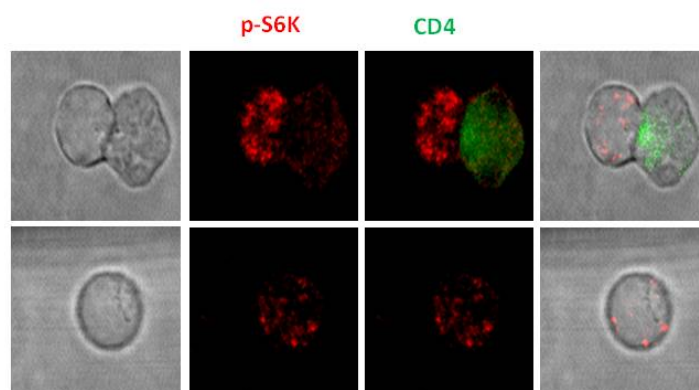


Figura 9. La autofagia inducida por la SI en la CD es independiente de mTORC1. Se comprobó por microscopía confocal la presencia de mTOR activo en las CDs tras la formación de la SI mediante el análisis de la fosforilación de su diana S6K. Se muestran imágenes representativas.

En conclusión, podemos afirmar que la SI induce la activación de un mecanismo de autofagia/mitofagia independiente de mTOR en la CD.

4. La autofagia inducida por la sinapsis inmunológica regula la generación de ROS mitocondriales en la célula dendrítica.

Como se ha comentado en la introducción, los ROS mitocondriales son capaces de inducir autofagia a través de múltiples mecanismos. Dado que nuestros resultados mostraban que la sinapsis inmunológica es capaz de inducir tanto la formación de ROS

de origen mitocondrial como la activación de la autofagia, quisimos analizar la relación que existía entre ambos procesos.

Para analizar esta relación, decidimos disminuir selectivamente la autofagia en las CDs eliminando el regulador de la autofagia Atg5. Con este propósito cruzamos ratones transgénicos Cd11c-Cre (Caton, Smith-Raska et al. 2007) con ratones Atg5^{flox/flox} (Hara, Nakamura et al. 2006), de manera que tan sólo se eliminaba el gen Atg5 en las células CD11c positivas (ver “Material y Métodos”).

En primer lugar caracterizamos las CDs procedentes de los ratones resultantes del cruce anterior (CD Atg5^{-/-}), analizando la presencia de Atg5 tanto a nivel génico mediante PCR, como protéico mediante *Western Blot* e inmunofluorescencia (Figura 10). Como se observa en las Figuras 10B y 10C, la expresión de Atg5 está prácticamente suprimida en las CDs Atg5^{-/-}, sin embargo, debido a que la eficiencia de la recombinación no es nunca del 100%, quedan niveles residuales de la proteína en las CDs Atg5^{-/-}.

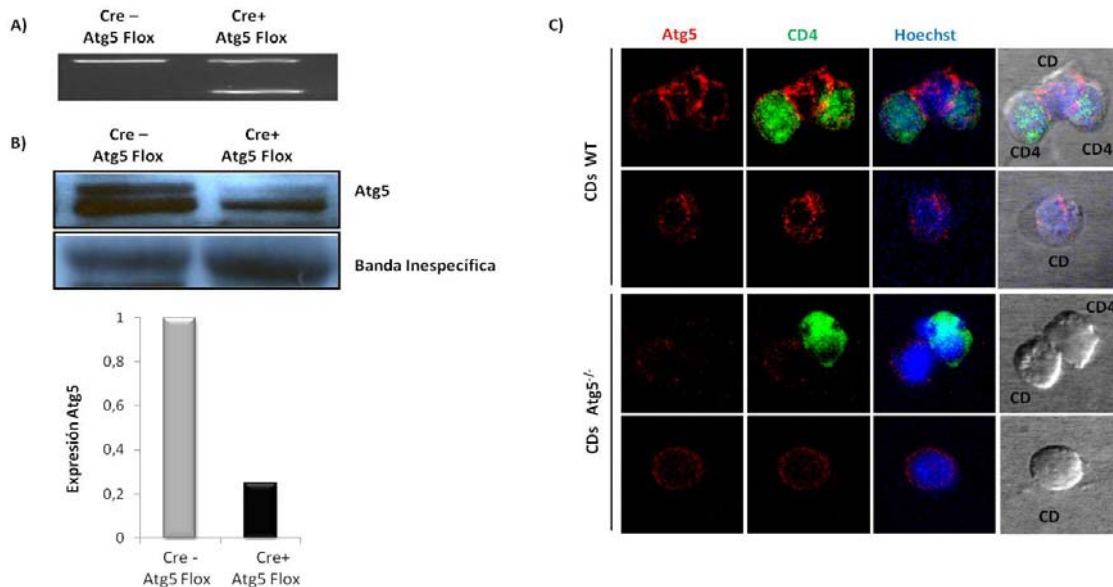


Figura 10. Obtención de ratones transgénicos CD11c-Atg5^{-/-}. A) Se extrajo el DNA de CDs de ratones Atg5^{-/-} y se amplificó el gen Atg5 para comprobar mediante PCR su eliminación. B) Se detectó la presencia de proteína Atg5 en las CDs por *Western Blot* y se cuantificaron los niveles residuales de Atg5. C) Se analizó mediante inmunofluorescencia los niveles de Atg5 que presentaban las CDs Atg5^{-/-} tanto solas, como tras la formación de la SI.

Una vez comprobada la eliminación de Atg5 de las CDs, decidimos estudiar si la ausencia de esta proteína en la célula alteraba la expresión fenotípica de determinados marcadores de superficie relacionados tanto con el linaje celular de las CDs del bazo (CD11b, CD8, CD4 y CD205), como con la maduración y la capacidad de presentación

antigénica de las CDs (CCR7, CD86 y MHCII). Para ello analizamos mediante citometría de flujo la expresión de dichos marcadores fenotípicos, pudiendo comprobar que la eliminación de Atg5 no altera la expresión en la membrana de los mismos, manteniendo niveles equivalentes a los que presentan las CDs de ratones C57BL/6 (CDs WT) (Figura 11).

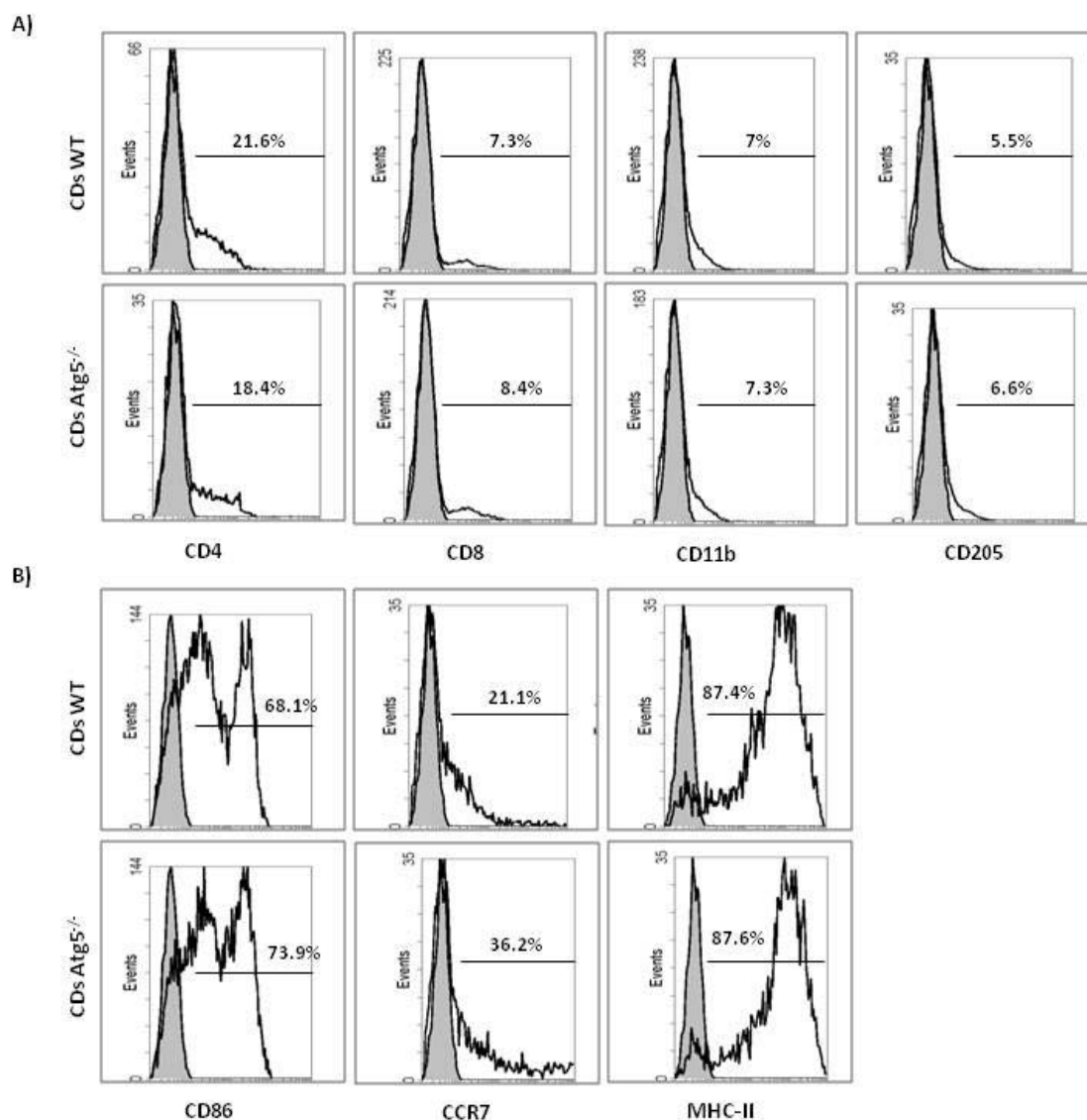


Figura 11. Caracterización fenotípica de las CDs Atg5^{-/-}. Para caracterizar las CDs Atg5^{-/-} se incubaron con anticuerpos que reconocen proteínas de membrana. Se analizó la expresión de, (A) CD4, CD8, CD11b y CD205, que permiten determinar las subclases de CDs; y (B) las proteínas CD86, CCR7 y MHCII, relacionadas con el grado de maduración y la capacidad de presentación antigénica de las CDs. Posteriormente se analizó la expresión de dichos marcadores mediante citometría de flujo.

Para corroborar la inhibición de la autofagia en las CDs Atg5^{-/-}, estudiamos la expresión de los diferentes marcadores autofágicos que habíamos analizado

previamente en las CDs WT (ver Figura 8). Para ello llevamos a cabo la formación de SI entre CDs $Atg5^{-/-}$ y linfocitos OTII, y analizamos las muestras mediante inmunofluorescencia. Como se puede ver en la Figura 12, la presencia de proteínas como Atg12 se encuentra disminuida en aquellas sinapsis formadas por CDs $Atg5^{-/-}$ (SI $Atg5$), en relación a las sinapsis formadas por CDs WT (SI WT). Por el contrario, la expresión de PINK1, Parkin o Beclina1, se encuentra incrementada debido a que el bloqueo de la autofagia impide que se eliminen del citoplasma de las CDs $Atg5^{-/-}$.

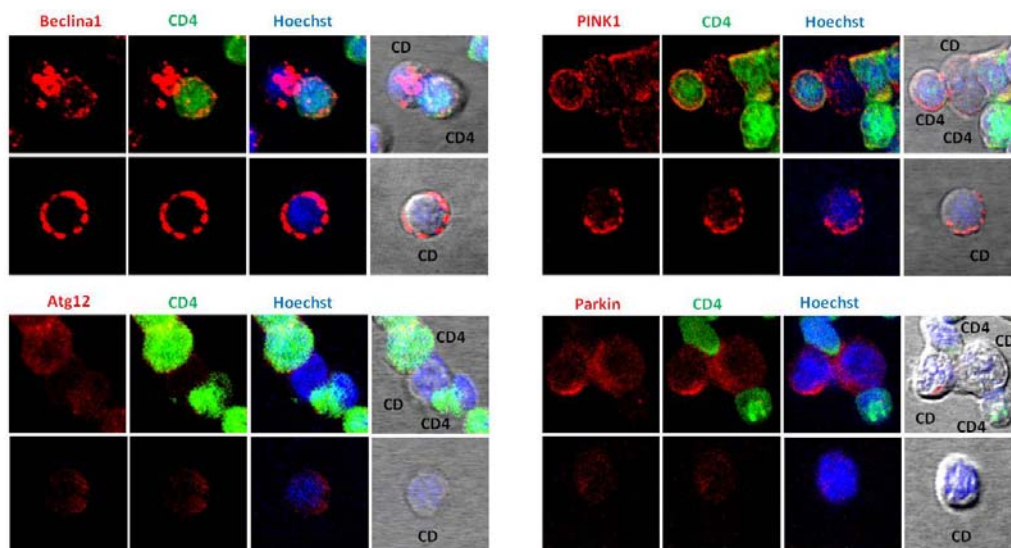


Figura 12. Como consecuencia de la eliminación del gen $Atg5$ en las CDs, se producen cambios en la presencia de determinados marcadores de autofagia. Se analizó mediante inmunofluorescencia la presencia de diferentes moléculas relacionadas con el proceso autofágico como Beclina1, que forma parte del complejo de iniciación de la autofagia; Atg12, que forma un complejo con Atg5, y PINK1 y Parkin, relacionadas con el marcaje de mitocondrias dañadas para su eliminación por mitofagia.

Una vez confirmada la inhibición de la autofagia en las CDs $Atg5^{-/-}$ procedimos a analizar los niveles de ROS que presentaban estas células. Para ello, llevamos a cabo la formación de SI $Atg5$ y SI WT, y determinamos mediante inmunofluorescencia los niveles de ROS tras 15 y 30 minutos de formación de sinapsis, para lo cual adicionamos al medio las sondas DHE o CellROX. El análisis de las muestras nos permitió confirmar que las CDs $Atg5^{-/-}$ que no se encuentran formando SI, presentan un incremento en de más del doble sus niveles de ROS con respecto a las CDs WT (Figura 13). Sin embargo, la formación de SI no es capaz de inducir un mayor aumento de los niveles de ROS en las CDs $Atg5^{-/-}$ (Figura 13). Este resultado sugiere que la autofagia es capaz de regular la producción de ROS en la célula, manteniendo unos niveles bajos de los mismos, y permitiendo así que puedan ser incrementados tras la formación de la SI, con el consiguiente efecto que ello tiene sobre la señalización celular.

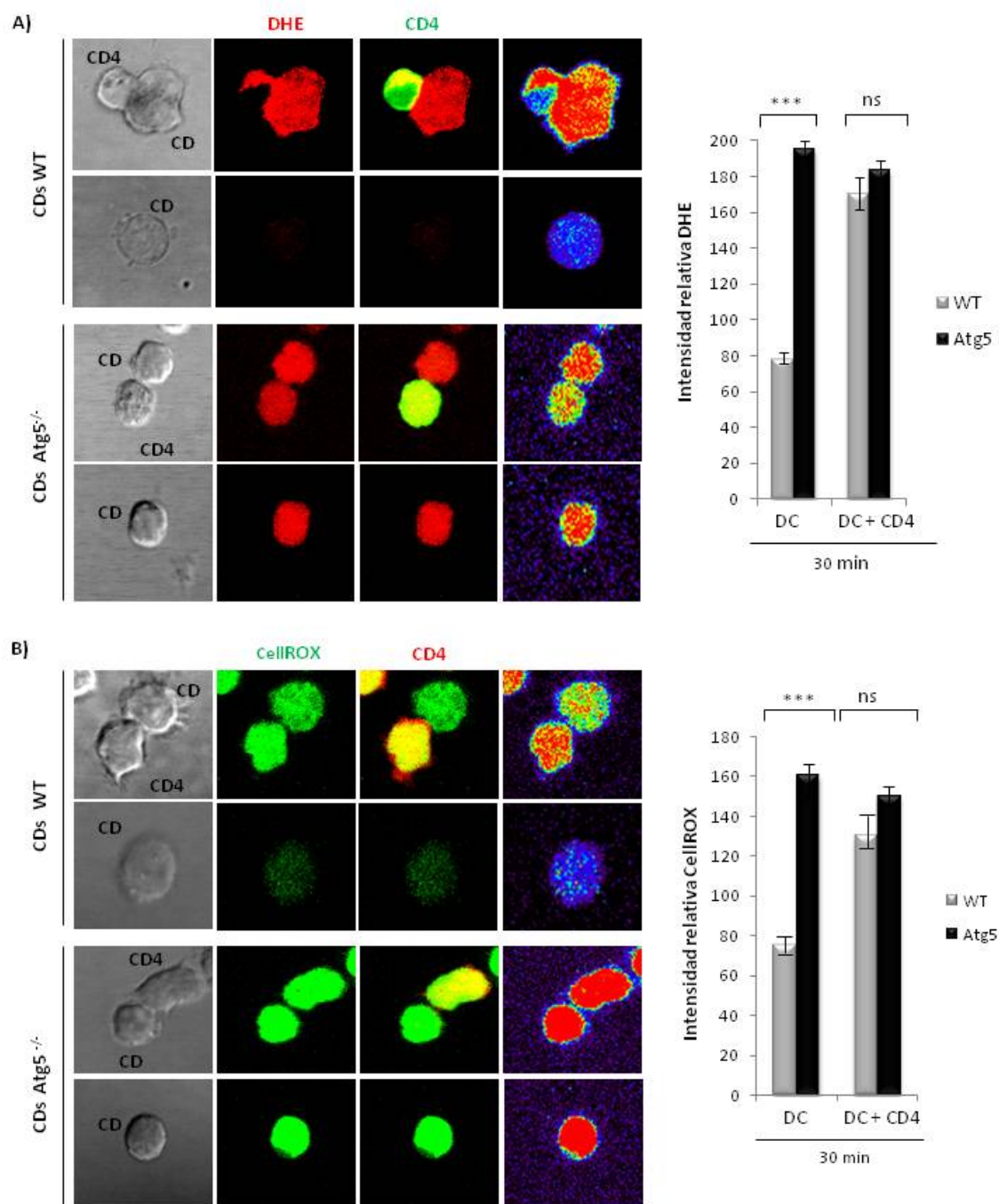


Figura 13. El incremento de ROS en las CDs Atg5^{-/-} se ve reflejado en un incremento en los niveles de ROS en los linfocitos con los que forman SI. Las CDs fueron incubadas con linfocitos T CD4 para inducir la formación de SI durante 30 minutos, en presencia de (A) DHE ó (B) CellROX. Se analizaron las muestras por microscopía confocal y se cuantificó la intensidad de fluorescencia para cada una de las dos sondas. Se muestran imágenes representativas de cada una de las tinciones y en las gráficas se representa la media de la intensidad relativa de fluorescencia \pm SD. *** $p \leq 0.0001$.

Se ha descrito que la eliminación del gen Atg5 produce una acumulación de mitocondrias en la célula, las cuales presentan además importantes alteraciones tanto funcionales como morfológicas (Stephenson, Miller et al. 2009; Tal, Sasai et al. 2009).

Dado que nuestros resultados previos confirmaban que los ROS inducidos por la SI tienen un origen mitocondrial, quisimos comprobar si el aumento en los niveles de dichos ROS en las CDs $Atg5^{-/-}$ tenían la misma procedencia.

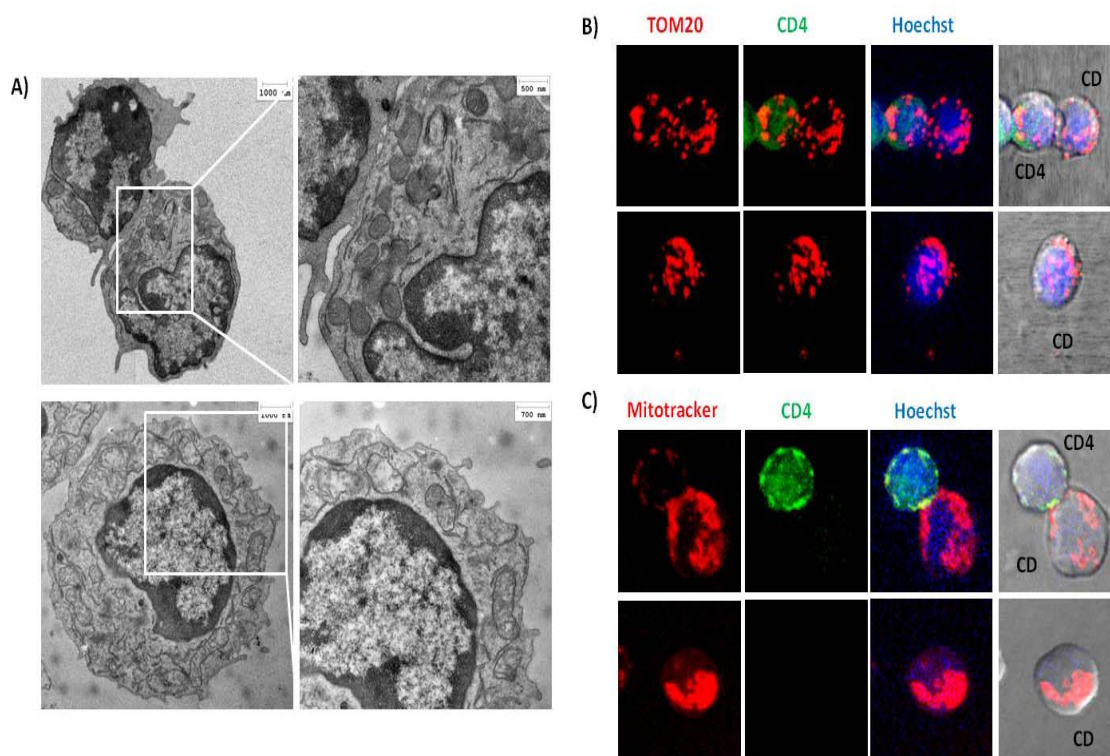


Figura 14. Las CDs $Atg5^{-/-}$ presentan mayores niveles de mitocondrias respecto a las CDs WT. A) Se analizó la SI mediante microscopía electrónica para detectar la presencia de mitocondrias en las CD $Atg5^{-/-}$. B) Se indujo la formación de SI con las CDs $Atg5^{-/-}$ y transcurridos 30 minutos, las muestras se fijaron y se adhirieron sobre cristales recubiertos con poli-ornitina, tiñéndose con el anticuerpo TOM20. Posteriormente las SI se analizaron mediante microscopía confocal. C) Se pretrataron las CDs $Atg5^{-/-}$ con Mitotracker (300 nM) durante 30 minutos y se llevó a cabo la formación de SI. Las muestras se observaron de igual modo por microscopía confocal.

En primer lugar, analizamos los niveles de mitocondrias presentes en las CDs $Atg5^{-/-}$. Para ello, al igual que con las CDs WT, comprobamos los niveles de mitocondrias mediante microscopía electrónica y mediante microscopía confocal, empleando en este último caso dos tinciones diferentes, una tinción con el colorante Mitotracker y una tinción con el marcador mitocondrial TOM20. Como se observa en la Figura 14, el análisis de las diferentes muestras confirma la presencia de mayores niveles de mitocondrias en las CDs $Atg5^{-/-}$ respecto a los que se observan en las CDs WT (ver figura 4), las cuales se disponen también en las proximidades de la zona de contacto con el linfocito en aquellas CDs que se encuentran formando SI.

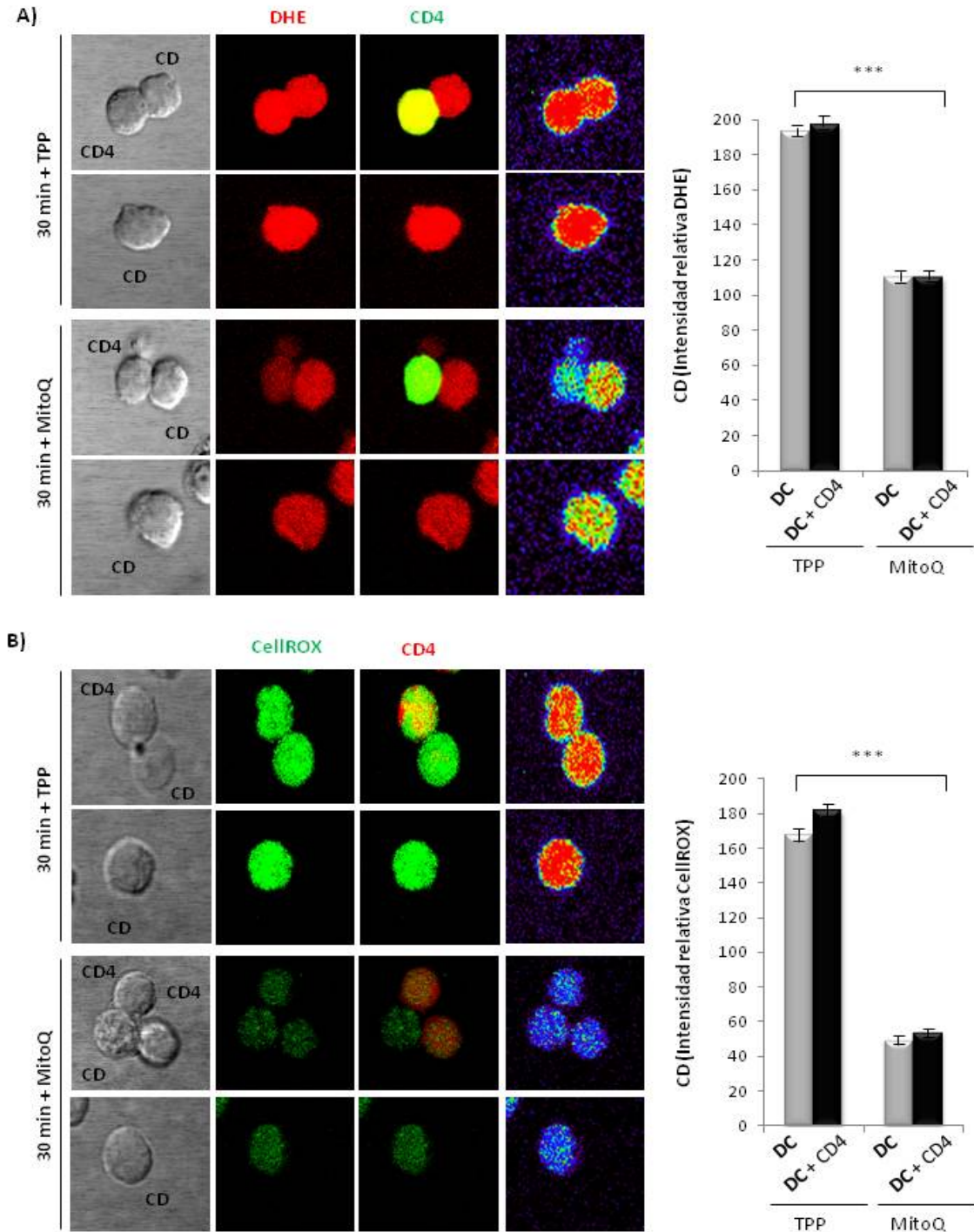


Figura 15. La mitocondria sigue siendo la principal fuente productora de ROS durante la SI en las CDs $Atg5^{-/-}$. Se pretrataron las CDs $Atg5^{-/-}$ con MitoQ o TPP, y se llevó a cabo la formación de SI durante 30 minutos adicionando al medio las sondas (A) DHE o (B) CellROX para detectar los niveles de $O_2^{\bullet -}$ presentes en la célula. Se analizaron las muestras mediante microscopía confocal y se cuantificó la intensidad de fluorescencia para cada una de las dos sondas. Se muestran imágenes representativas de cada una de las tinciones y en las gráficas se representa la media de la intensidad relativa de fluorescencia \pm SD. *** $p \leq 0.0001$.

Una vez confirmada la existencia de mayor cantidad de mitocondrias en las CDs Atg5^{-/-}, quisimos corroborar que los elevados niveles de ROS que se observan en estas células tenían su origen en las mitocondrias. Para ello, estudiamos el efecto que tenía el bloqueo selectivo de la cadena de transporte mitocondrial, sobre la producción de ROS en dichas células. Con este fin pretratamos las CDs Atg5^{-/-} con MitoQ o TPP durante 30 minutos, y posteriormente llevamos a cabo la formación de SI, en presencia de DHE o CellROX. El análisis de las muestras por microscopía nos permitió comprobar que el tratamiento con MitoQ provoca una reducción en los niveles de ROS en las CDs Atg5^{-/-}, tanto en las que se encuentran solas como las que están formando SI (Figura 15). Este resultado nos permitió confirmar que el bloqueo de la autofagia en la CD desencadena un aumento en los niveles de ROS mitocondriales.

Se ha descrito en estudios previos, que la SI es capaz de inducir supervivencia en las CDs (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009), y dado que la autofagia se ha considerado un mecanismo de supervivencia celular, quisimos estudiar si el efecto inductor de supervivencia que se observaba en las CDs al formar SI se debía en parte a la inducción de la autofagia. Para ello, llevamos a cabo la formación de SI WT y Atg5 en medio con ausencia de suero, y analizamos a diferentes tiempos la apoptosis que sufrían estas CDs. Para este fin analizamos las modificaciones en la morfología del núcleo, como son el cambio en la condensación y en la fragmentación de la cromatina, que puede ser observado mediante tinción con Hoechst 33342. Esta técnica es una de las más sencillas y fiables para analizar la apoptosis, dado que la condensación nuclear es exclusiva del proceso apoptótico.

Tras cuantificar el número de CDs que presentaban núcleos condensados o fragmentados, pudimos comprobar que el porcentaje de CDs Atg5^{-/-} solas y en proceso de apoptosis era mucho mayor que el que se observaba en el caso de las CDs WT, lo que indica que la autofagia tiene un papel anti-apoptótico en las CDs (Figura 16). Sin embargo, al analizar las CDs que se encontraban formando SI, comprobamos que la formación de SI es capaz de inducir supervivencia en las CDs Atg5^{-/-}. Estos resultados confirman por tanto, la potente capacidad de inducción de supervivencia por parte de la SI y muestran que la autofagia no es necesaria para los efectos pro-supervivencia que induce la formación de la SI en las CDs.

5. Los ROS generados en la mitocondria durante la sinapsis inmunológica inducen la activación de la señalización a partir de TCR/CD28 en los linfocitos T.

Hasta ahora hemos estado hablando exclusivamente de que la SI induce la producción de ROS y la activación de la autofagia en la CD. Llegados a este punto nos plantemos averiguar qué papel desempeñaban estos ROS mitocondriales de la CD, puesto que aunque tradicionalmente habían estado relacionados con inflamación, cada vez existen más evidencias que demuestran su papel como reguladores inmunes (Yan and Banerjee 2010; Kotsias, Hoffmann et al. 2013).

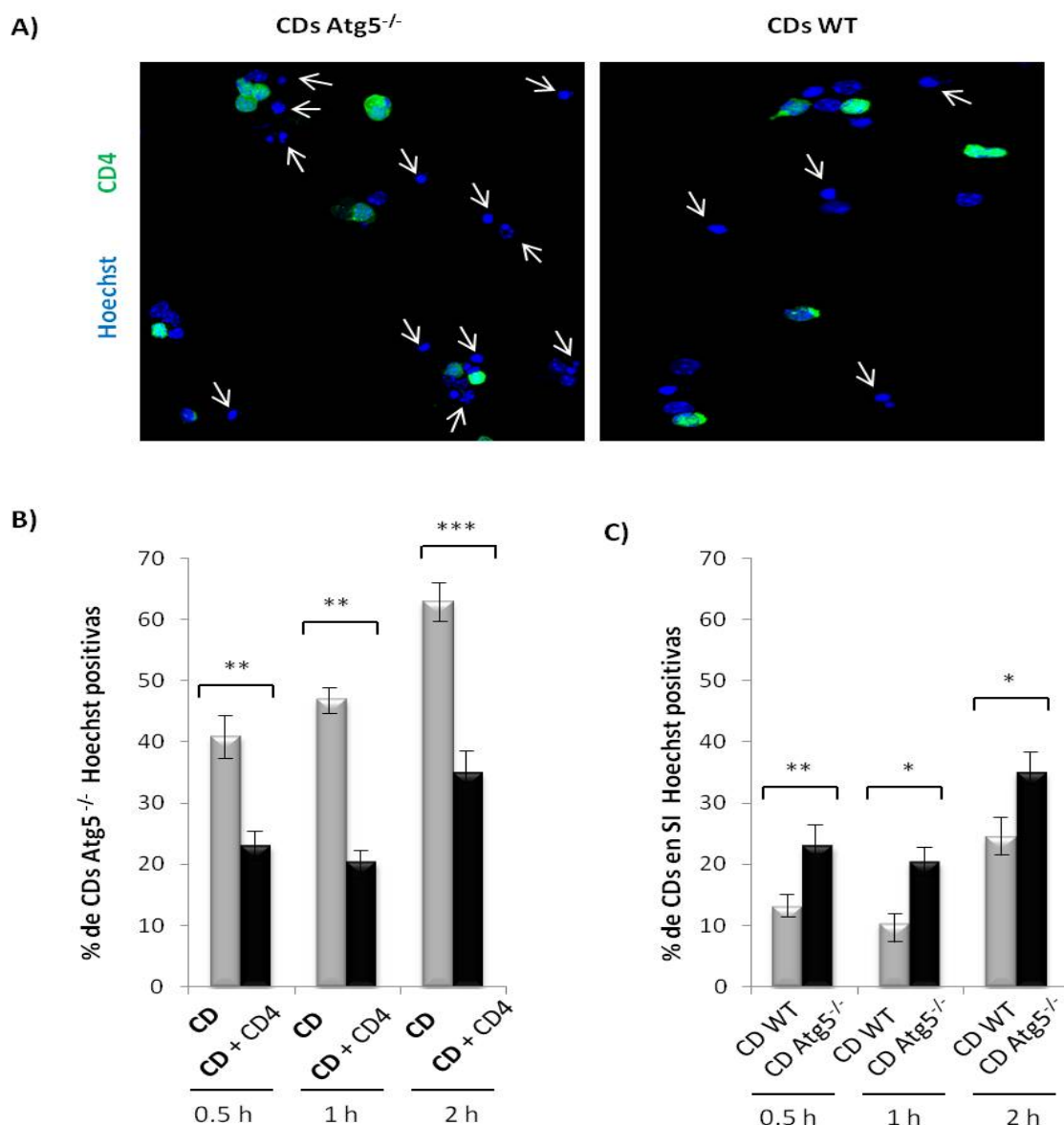


Figura 16. La SI y la autofagia tienen un papel protector para las CDs. Se llevó a cabo la formación de SI en medio sin suero, analizándose posteriormente la apoptosis celular mediante tinción con Hoechst (A). Se contabilizó la cantidad de núcleos fragmentados o condensados, indicadores de muerte celular por apoptosis. Se representa la media \pm SD del porcentaje de CDs con núcleos apoptóticos (B) y (C). * $p \leq 0.01$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$.

Estudios previos han demostrado que los linfocitos requieren un medio reducido en la zona de la SI para una óptima activación y proliferación, siendo las CDs las responsables de esta modulación redox del espacio extracelular (Angelini, Gardella et al. 2002; Yan, Garg et al. 2009; Martner, Aurelius et al. 2011). Basándonos en estas observaciones previas, decidimos analizar si los ROS mitocondriales que se estaban produciendo en la CD a consecuencia de la formación de la SI, eran capaces de modificar la activación y proliferación del linfocito T.

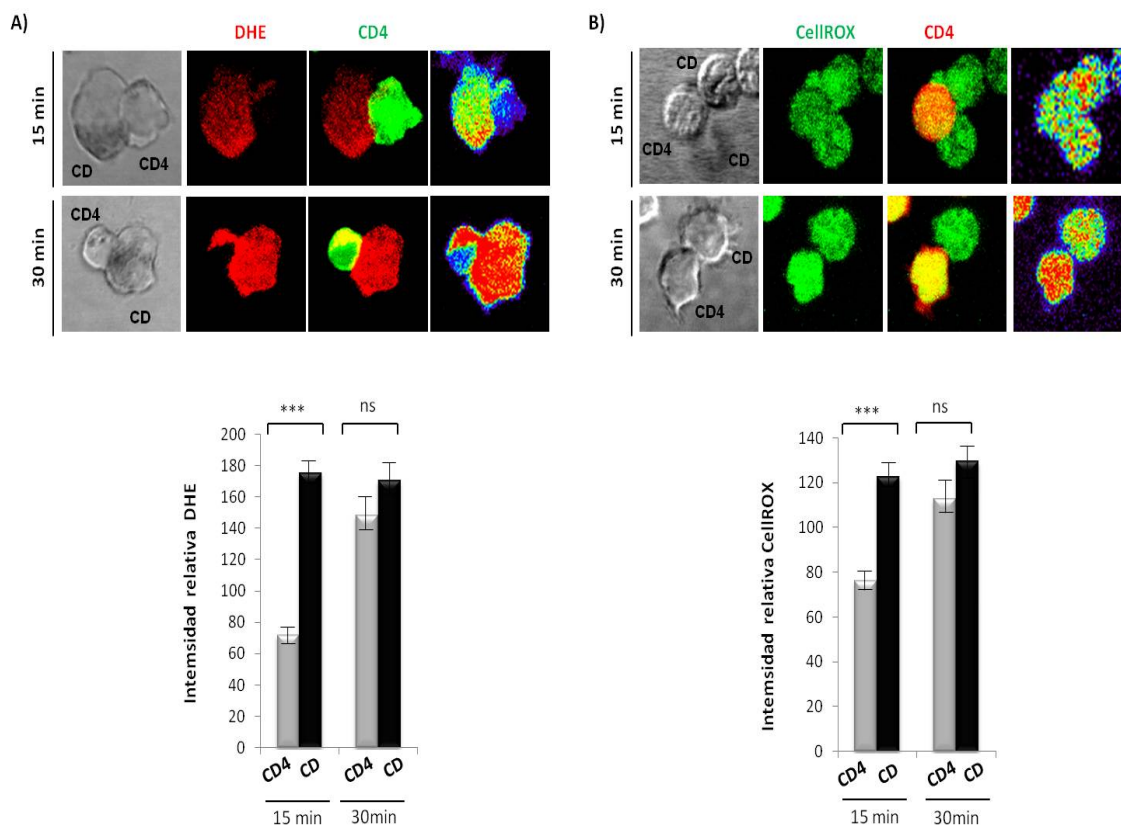


Figura 17. Los niveles de ROS en el linfocito durante la SI están relacionados con los niveles de ROS en la CD. Se indujo la formación de SI durante 15 ó 30 minutos, adicionando al medio las sondas (A) DHE ó (B) CellROX. Las muestras se analizaron por microscopía confocal y se cuantificó la intensidad de fluorescencia en el linfocito para cada una de las dos sondas. Se muestran imágenes representativas de cada una de las tinciones y en las gráficas se representa la media de la intensidad relativa de fluorescencia \pm SD. *** $p \leq 0.0001$.

Con este fin, analizamos en primer lugar los niveles de ROS que había en el linfocito tras la formación de la SI. Para ello llevamos a cabo la formación de SI en presencia de DHE o CellROX, analizando las muestras por microscopía confocal. En la Figura 17 se puede observar que a tiempos cortos tras la formación de la SI (15 minutos) los ROS aparecen primero en la CD, mientras que pasados 30 minutos la fluorescencia del DHE o del CellROX es similar en ambas células, es decir, presentan niveles de ROS similares. Estos resultados parecen indicar la existencia de una relación entre los ROS que se producen en ambos tipos celulares.

Quisimos comprobar si el efecto que observábamos sobre la producción de ROS en el linfocito tras la formación de la SI, estaba mediado por los ROS mitocondriales procedentes de la CD. Para comprobar esto, pretratamos las CDs con MitoQ o TPP durante 30 minutos y llevamos a cabo la formación de SI, en presencia de DHE o CellROX. Como se observa en la Figura 18, la inhibición de la producción de ROS mitocondriales en las CDs da lugar a una disminución en la generación de ROS en los linfocitos con los que se encuentran en contacto. Este resultado junto con el anterior

(Figura 17), nos sugiere que los ROS mitocondriales que se originan en la CD a consecuencia de la formación de la SI, afectan a la producción de ROS en el linfocito T.

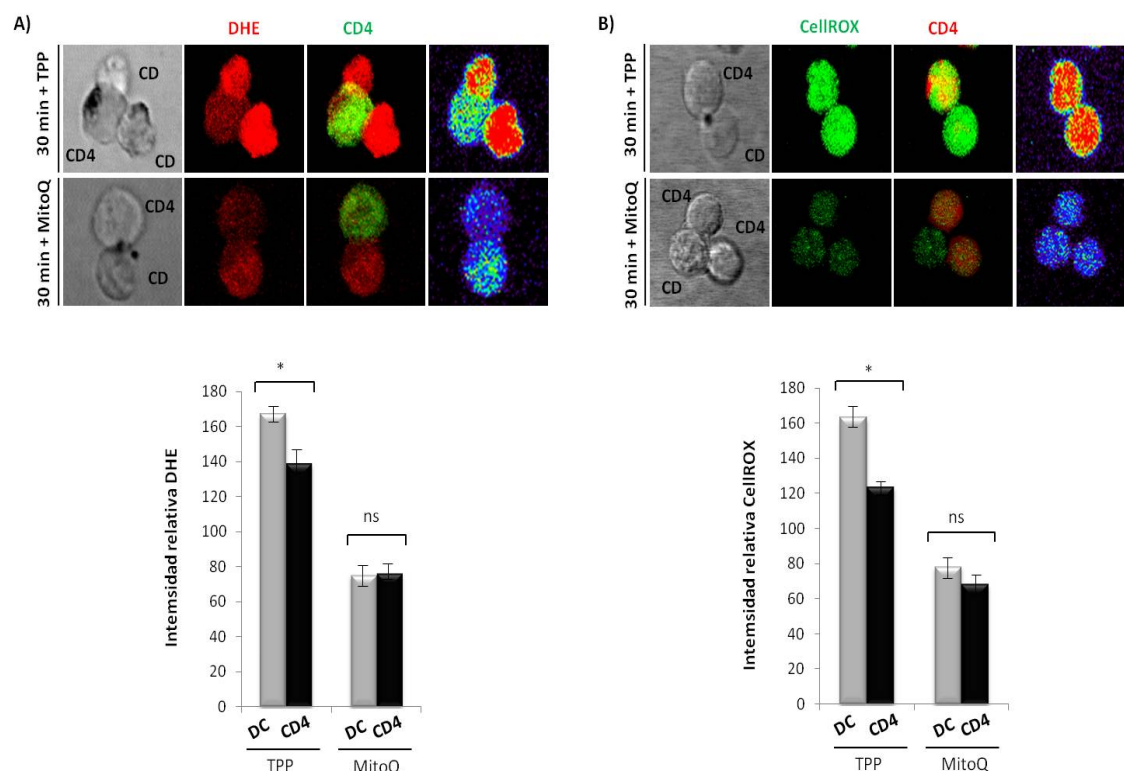


Figura 18. La inhibición de la producción de ROS mitocondriales en la CD, afecta a los niveles de ROS del linfocito durante la SI. Se pretrataron las CDs con MitoQ o TPP, y se llevó a cabo la formación de SI durante 30 minutos adicionando al medio las sondas (A) DHE o (B) CellROX para detectar los niveles de $O_2^{\cdot-}$ presentes en el linfocito. Se analizaron las muestras por microscopía confocal y se cuantificó la intensidad de fluorescencia en el linfocito para cada una de las dos sondas. Se muestran imágenes representativas de cada una de las tinciones y en las gráficas se representa la media de la intensidad relativa de fluorescencia \pm SD. * $p \leq 0.01$.

Finalmente, analizamos los niveles de ROS presentes en los linfocitos T cuando la SI tenía lugar con las CDs $Atg5^{-/-}$. El análisis mediante microscopía confocal de las SI formadas por estas CDs y los linfocitos T CD4, confirmó la relación existente entre los niveles de ROS de ambas células, puesto que al incrementarse los ROS mitocondriales en las CDs $Atg5^{-/-}$, también se incrementan en los linfocitos con los que se encuentran en contacto (Figura 19). Además, al igual que ocurre con las CDs WT, el pretratamiento de las CDs $Atg5^{-/-}$ con MitoQ o TPP, causa una reducción similar en los niveles de ROS en la CD y en el linfocito T (Figura 20).

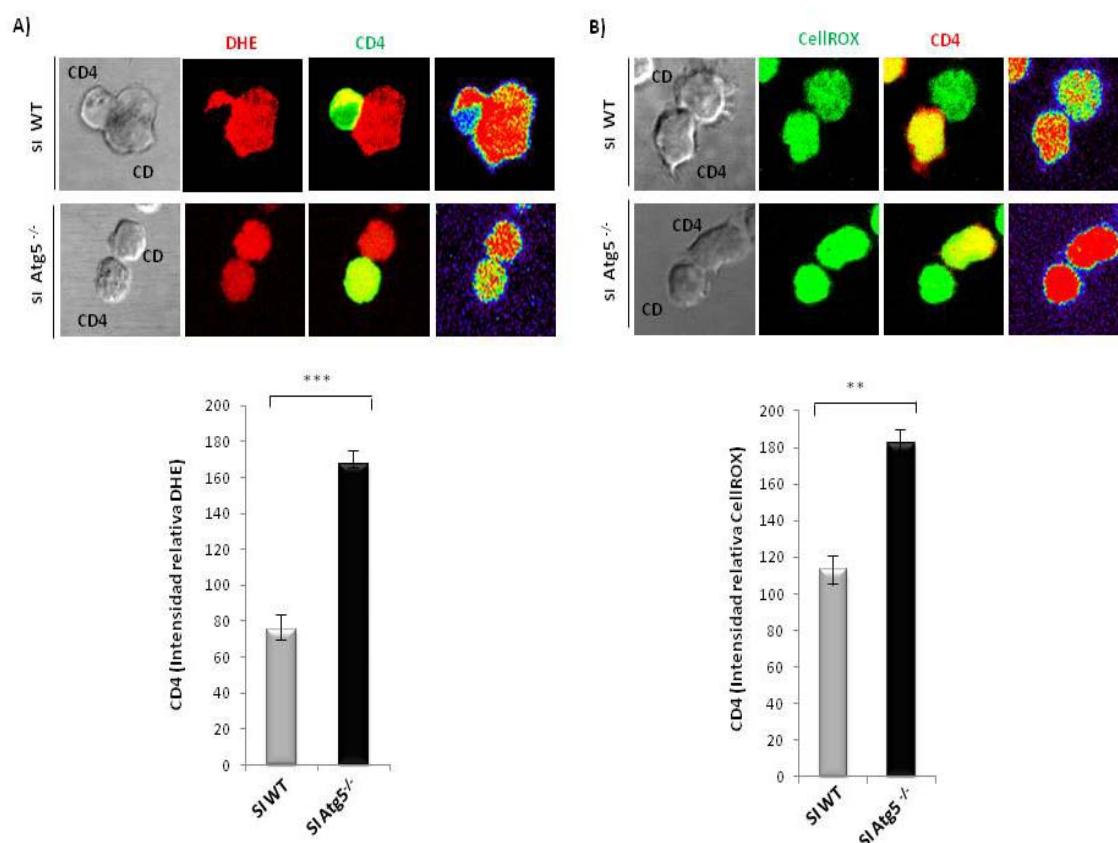


Figura 19. El incremento de los niveles de ROS en la CDs Atg5^{-/-} se ve reflejado en un incremento de los mismos en el linfocito T. Se indujo la formación de SI con CDs Atg5^{-/-} durante 30 minutos, en presencia de (A) DHE o (B) CellROX. Se analizaron las muestras por microscopía confocal y se cuantificó la intensidad de fluorescencia en el linfocito. Se muestran imágenes representativas de cada una de las tinciones y en las gráficas se representa la media de la intensidad relativa de fluorescencia \pm SD. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$.

En conjunto, estos resultados sugieren que tras la formación de la SI los niveles de ROS en los linfocitos T, reflejan los niveles de ROS mitocondriales existentes en las CDs.

Una vez confirmada la importancia de los ROS mitocondriales procedentes de la CD, analizamos el efecto que ejercían sobre la activación y proliferación del linfocito T. Está ampliamente descrito que la estimulación de los linfocitos T por parte de las CDs, resulta en la activación de diferentes vías de señalización en el interior del linfocito, incluyendo la fosforilación de diferentes proteínas como PKC θ y la molécula adaptadora LAT entre otras (Yan and Banerjee 2010; Lopez-Huertas, Mateos et al. 2011). Por este motivo decidimos estudiar la activación del linfocito T, basándonos en los cambios de fosforilación que presentaban dichas proteínas. Para ello, pretratamos las CDs WT y CDs Atg5^{-/-} con MitoQ o TPP con el fin de modificar los niveles de ROS, y llevamos a cabo la formación de SI. Tras esto, analizamos por *Western Blot* los niveles de fosforilación de las proteínas PKC θ y LAT a diferentes tiempos en el linfocito,

aprovechándonos del hecho de que estas proteínas se expresan en el linfocito T pero no en la CD.

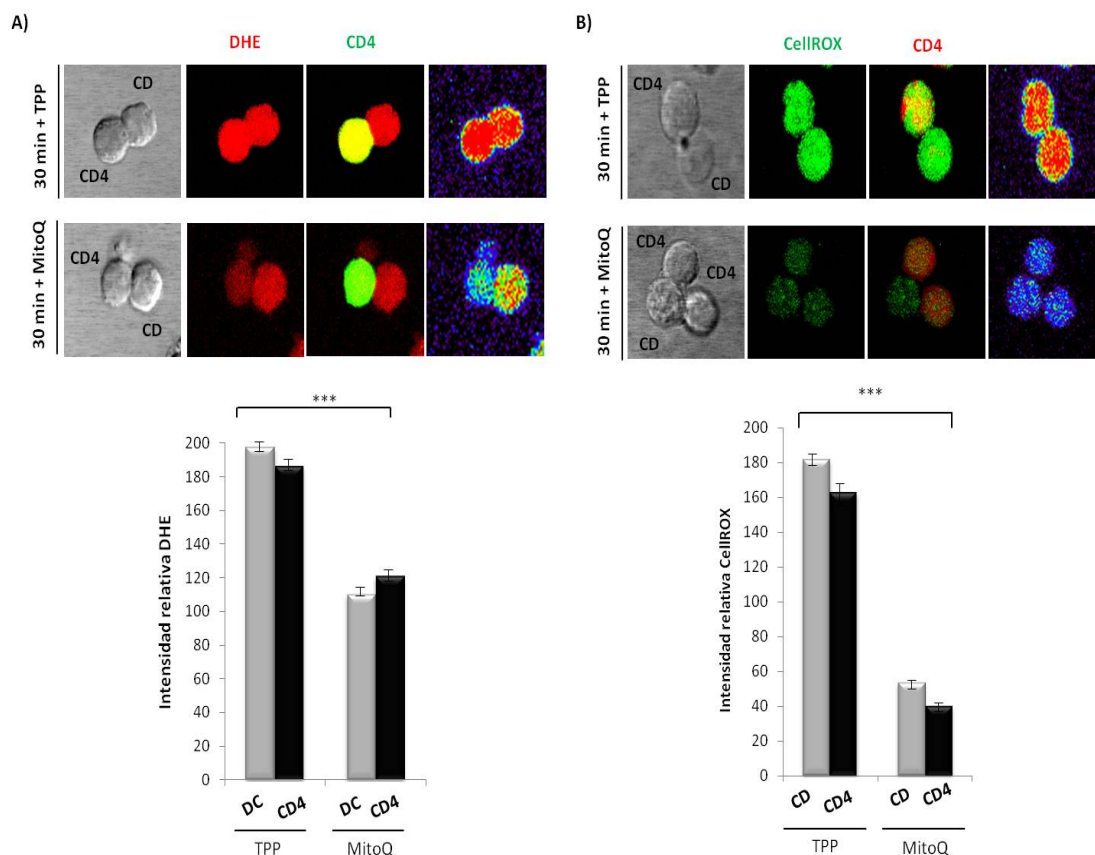


Figura 20. La inhibición de la producción de ROS mitocondriales en las CDs $Atg5^{-/-}$, produce una disminución de los niveles de ROS en el linfocito T durante la SI. Se pretrataron las CDs $Atg5^{-/-}$ con MitoQ o TPP, y se llevó a cabo la formación de SI durante 30 minutos añadiendo al medio (A) DHE o (B) CellROX. Se analizaron las muestras por microscopía confocal y se cuantificó la intensidad de fluorescencia en el linfocito T para cada una de las dos sondas. Se muestran imágenes representativas de cada una de las tinciones y en las gráficas se representa la media de la intensidad relativa de fluorescencia \pm SD. *** $p \leq 0.0001$.

Como se puede observar en la Figura 21, los niveles de fosforilación de PKC θ disminuyen al bloquear la producción de ROS mitocondriales en ambos tipos de CDs. Sin embargo, los niveles de fosforilación de LAT apenas se ven modificados al alterarse los niveles de ROS mitocondriales en las CDs. Puesto que la fosforilación de LAT depende del TCR y la fosforilación de PKC θ está controlada por la molécula coestimuladora CD28, estos datos sugieren que la señalización a través del TCR no se ve modificada de manera significativa por los niveles de ROS, pero sí la señalización a partir de CD28.

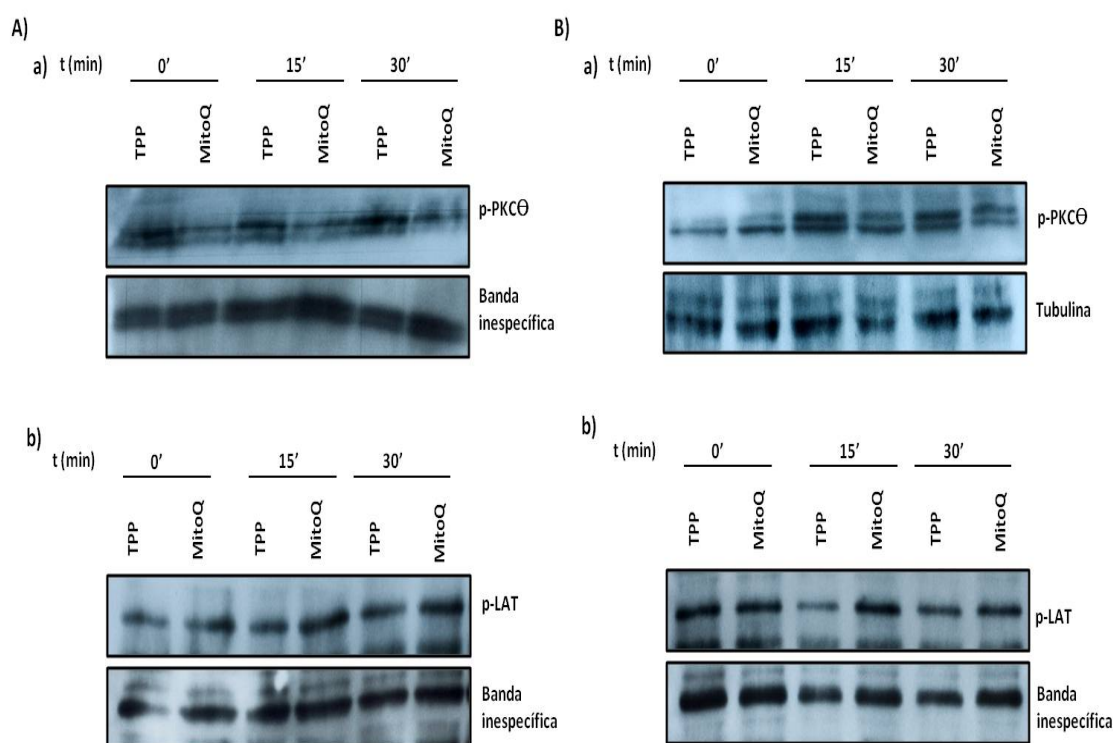


Figura 21. La inhibición de la producción de ROS mitocondriales en las CDs se reflejan en una menor activación de PKCθ en el linfocito T. Se pretrataron las CDs WT (A) y las CDs Atg5^{-/-} (B) con MitoQ o TPP. Se indujo la formación de SI y se analizaron por *Western Blot* a diferentes tiempos, los niveles de fosforilación de PKCθ (A(a) y B(a), y los niveles de fosforilación de LAT (A(b) y B(b)).

Finalmente, debido a que los ROS producidos en las CDs afectan a moléculas clave de la activación de los linfocitos T, como es el caso de PKCθ, analizamos si estos ROS afectaban también la proliferación de los linfocitos T. Para este fin estudiamos la expresión por citometría de CD69, un marcador de activación temprana en los linfocitos T. Como se puede ver en la Figura 22A, los linfocitos T que forman SI con las CDs Atg5^{-/-}, presentan niveles de CD69 en su membrana superiores a los que aparecen en los linfocitos que han formado SI con las CDs WT.

Por último, estudiamos también la proliferación de dichos linfocitos mediante el análisis por citometría de los cambios en la tinción con CFSE (Figura 22B). Estos ensayos confirmaron que no sólo se modifica la activación de los linfocitos T, sino también su proliferación, en relación a los niveles de ROS presentes en las CDs con las que se encuentran formando SI.

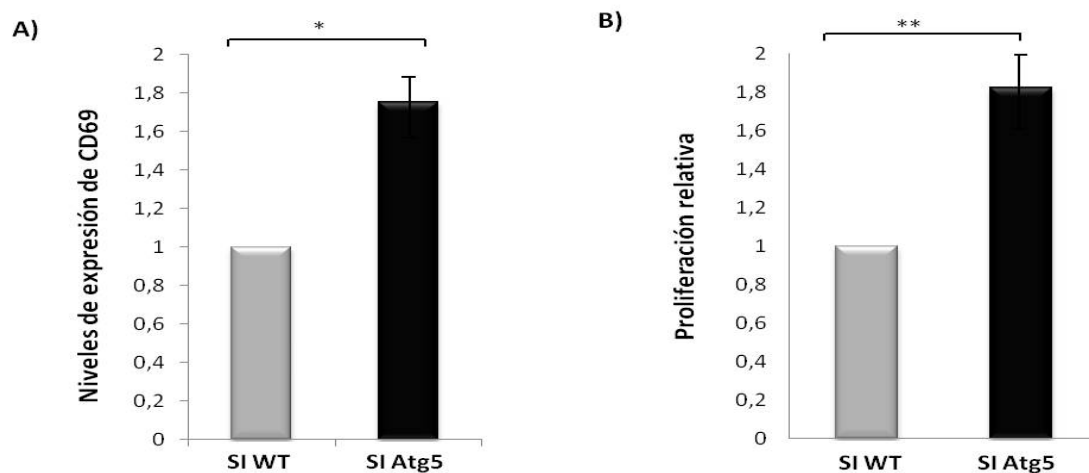


Figura 22. Los niveles de ROS presentes en las CDs afectan a la maduración y proliferación de los linfocitos T. Se llevó a cabo la formación de SI tanto con CDs WT como con CDs Atg5^{-/-}. A) Trascurridas 12 horas tras la formación de la SI se midieron por citometría de flujo los niveles de expresión de CD69 en la superficie de los linfocitos T. * $p \leq 0.01$. B) Tras 24 horas de SI se midió la proliferación de los linfocitos T mediante el análisis de la disminución en los niveles de CFSE debido a los sucesivos ciclos de división celular. * $p < 0.01$, ** $p \leq 0.001$

En conclusión, los resultados indican que los ROS generados en la mitocondria de las CDs tras la formación de la SI, son importantes para la activación y proliferación mediada por PKC θ de los linfocitos T.

DISCUSIÓN

La mayor parte de los estudios realizados sobre la SI se han centrado en el análisis de dicha estructura en el linfocito T (Friedl, den Boer et al. 2005; Dustin 2009); sin embargo, resultados recientes indican que la formación de la SI afecta a funciones de la CD que favorecen su capacidad para activar al linfocito T (Angelini, Gardella et al. 2002; Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009; Yan and Banerjee 2010). En este sentido, resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran, que la formación de una SI incrementa la supervivencia de las CDs, lo que permite a dichas células activar de manera eficiente a los linfocitos T en los ganglios linfáticos (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009). Por estos motivos decidimos continuar con el estudio de las funciones de las CDs que pudieran estar reguladas por la formación de la SI. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la formación de la SI juega un papel importante en la modulación de la activación de los linfocitos T, a través de la generación de ROS mitocondriales en la CD. Además, mostramos que los niveles de estos ROS producidos en la CD se encuentran regulados mediante un mecanismo de autofagia/mitofagia (Modelo 1).

Observamos en primer lugar, que la formación de una SI entre un linfocito T y la CD conduce a la formación de ROS en esta última célula. El análisis de los niveles de ROS en las CDs se llevó a cabo mediante el empleo de Dihidroetidina (DHE) y CellROX, dos sondas capaces de detectar la presencia de ROS en el interior de la célula. Los ensayos realizados *in vitro*, nos han permitido demostrar que la SI desencadena un estrés oxidativo en el interior de la CD, lo que se refleja en un incremento significativo en los niveles de ROS de dicha célula tan sólo 15 minutos tras la formación de la SI (Figura 1). Del mismo modo, ensayos realizados *in vivo* confirmaron la existencia de este *burst* oxidativo en la CD tras la formación de la SI (Figura 2). Este hecho está en concordancia con datos previos existentes en la literatura que apuntaban al papel clave de los ROS para una eficiente crosrepresentación antigénica (Kotsias, Hoffmann et al. 2013), para una correcta eliminación de patógenos en el interior de los fagosomas (Holmdahl, Sareila et al. 2013) y para la regulación de las vías de señalización que controlan la expresión de citoquinas en las CDs (Jendrysik, Vasilevsky et al. 2011).

Se ha descrito ampliamente que en las células de mamífero la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes de $O_2^{\cdot-}$, el cual puede transformarse en H_2O_2 y en otras especies reactivas como el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Smith, Hartley et al. 2012). Este $O_2^{\cdot-}$ se origina fundamentalmente en los complejos I y III de la cadena de transporte mitocondrial, aunque también en menor medida en el complejo II (Murphy 2009). Los complejos I y II liberan el $O_2^{\cdot-}$ al interior de la matriz mitocondrial, donde por efecto de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) se transforma en H_2O_2 . Sin embargo, el complejo III libera el $O_2^{\cdot-}$ producido tanto a la matriz mitocondrial como al espacio intermembrana, desde donde puede acceder directamente al citoplasma (Han, Antunes et al. 2003; Muller, Liu et al. 2004). Con el fin de estudiar si el incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ que observábamos en la CD tras la formación de la SI tenía su origen en la mitocondria, empleamos un inhibidor selectivo del complejo III de la cadena de transporte mitocondrial, el MitoQ, y su forma inactiva TPP como control. El análisis de

los resultados nos permitió confirmar que la producción de ROS que tiene lugar en el interior de la CD durante la formación de la SI, tiene su origen en la mitocondria de dichas células (Figura 3), la cual tiene un papel clave durante la SI puesto que al bloquearla específicamente, se produce una drástica disminución en los niveles de ROS en el interior de la CD.

Puesto que se sabe que cuando se forma una SI las mitocondrias presentes en el linfocito T se distribuyen principalmente en la zona de contacto con la CD, analizamos también si este fenómeno ocurría en la CD tras la formación de dicha SI (Quintana, Schwindling et al. 2007; Contento, Campello et al. 2010). Como se observa en la Figura 4, comprobamos que las mitocondrias de la CD se redistribuyen por las proximidades de la SI, al igual que ocurre en el linfocito T.

La mitocondria, además de ser una fuente productora de ROS, es también una diana para los mismos, lo que puede desencadenar alteraciones tanto en sus proteínas y lípidos como en su ADN, que conducen a la despolarización y el daño mitocondrial (Lee, Dinner et al. 2003). Por este motivo, y dada la importancia que tiene este orgánulo en nuestro sistema, decidimos analizar si debido a la intensa producción de ROS que tiene lugar durante la SI, estas mitocondrias pudieran estar dañadas. Estudios previos habían confirmado que el daño oxidativo en la mitocondria desencadenaba una despolarización o pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), a consecuencia de la apertura de poros de permeabilidad transitoria (MPTP) en dicha membrana (Gottlieb and Carreira 2010; Smith, Hartley et al. 2012; Wang, Nartiss et al. 2012). En los ensayos de sinapsis que llevamos a cabo añadiendo el indicador del potencial de membrana JC-1, pudimos comprobar que el número de mitocondrias que presentaban una despolarización de su membrana era mayor en aquellas CDs que se encontraban formando SI respecto a las que no la formaban (Figura 5), presentando un menor $\Delta\psi_m$. Esta disminución del $\Delta\psi_m$ en las CDs que están formando SI, es algo menor a la producida por el CCCP, un agente que bloquea la cadena respiratoria mitocondrial, produciendo una rápida disipación del gradiente de protones.

Hasta este momento habíamos confirmado la existencia de un estrés oxidativo en la CD tras la formación de la SI, que desencadena una alteración en las mitocondrias de dichas células a consecuencia de un incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en las mismas. Es importante destacar el hecho de que la integridad mitocondrial es fundamental para la homeostasis celular, sin embargo, un daño en la mitocondria puede desencadenar una importante alteración de la función celular, pudiendo desencadenar un proceso apoptótico a consecuencia de la liberación de citocromo C y otros factores pro-apoptóticos al citoplasma (Gottlieb and Carreira 2010). Sin embargo, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la SI es capaz de inducir supervivencia en la CD a través de la inducción de señales intracelulares que inhiben la apoptosis (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009). Esto implica la existencia en la célula de un eficiente mecanismo de control que permita la eliminación de las mitocondrias dañadas debido al incremento en la producción de ROS. Se sabe además, que las mitocondrias

dañadas pueden ser eliminadas por autofagia, más concretamente mitofagia (Chan 2006; Westermann 2010).

Para profundizar en los mecanismos de eliminación de las mitocondrias dañadas en la CD, quisimos analizar en primer lugar si la autofagia/mitofagia podría estar involucrada en los procesos que regulan la calidad mitocondrial y la generación de ROS tras la formación de la SI. El estudio de la autofagia lo llevamos a cabo mediante el empleo de ratones transgénicos GFP-LC3 C57BL/6 (Mizushima, Yamamoto et al. 2004) de los cuales obtuvimos las CDs. Estos ratones nos proporcionaban la ventaja de poder seguir el proceso autofágico exclusivamente en las CDs mediante la monitorización de los niveles de GFP-LC3II, el marcador más fiable de autofagia descrito hasta el momento al permanecer unido a la membrana del autofagosoma durante todo el proceso, lo que nos permitía determinar la abundancia de estas estructuras en la célula (Mizushima 2004). Además, para asegurarnos de que estábamos midiendo el flujo autofágico, y no una reducción proteolítica del LC3, realizamos los experimentos en presencia de los inhibidores de proteasas E-64d y pepstatina, que impiden la degradación del autofagosoma en el lisosoma.

El análisis de los niveles de autofagia mediante microscopía confocal de fluorescencia y citometría de flujo, nos permitió demostrar la inducción de la autofagia en la CD tras la formación de la SI. La microscopía confocal muestra el aumento de *puncta* GFP-LC3II en las CDs que se encuentran formando SI respecto a las que se encuentran solas, y además se puede observar que dichas estructuras se encuentran localizadas próximas a la zona de contacto con el linfocito T, lo que sugiere que la autofagia tiene lugar de manera selectiva en dicha región de la CD (Figura 6). Este hecho se confirma además, con la presencia en la zona próxima a la SI de diferentes moléculas claves en el proceso autofágico como Beclina1, Atg5 y Atg12 (Figura 8A). Nuestros resultados están en concordancia con los datos publicados durante el desarrollo final de esta Tesis Doctoral por el doctor D.W. Hommes y colaboradores, quienes comprobaron también que los niveles de autofagia en la CD aumentan tras la formación de la SI, con una localización polarizada de los autofagosomas hacia la zona de contacto (Wildenberg, Vos et al. 2012).

Este resultado es interesante dado que se sabía que la SI induce la activación en la CD de la ruta de Akt/mTOR (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009). mTOR es uno de los inhibidores clásicos de autofagia, puesto que hiperfosforila Atg13 impidiendo su asociación con Atg1 y la consiguiente formación del autofagosoma (Lee, Kim et al. 2007). Los datos indicaban por tanto, que la autofagia inducida tras la formación de la SI tiene lugar incluso cuando la quinasa mTORC1 está activa. Sin embargo, en las etapas iniciales del desarrollo de la presente Tesis Doctoral se publicó el trabajo del doctor J. Yuan y colaboradores, quienes afirmaban la existencia de rutas autofágicas independientes de mTORC1 (Lipinski, Hoffman et al. 2010), lo que apoya por lo tanto nuestros resultados y nos permite confirmar la inducción de una autofagia independiente de dicha molécula en las CDs a raíz de la formación de la SI (Figura 9).

Tras observar que la formación de la SI induce autofagia, quisimos estudiar la cinética que presentaba la autofagia en nuestras células, para lo cual llevamos a cabo un análisis por *Western Blot* a diferentes tiempos de la aparición en la CD de GFP-LC3II. Los resultados obtenidos confirman una vez más, una rápida inducción de la autofagia en la CD pues tan sólo 15 minutos tras la formación de la SI, somos capaces de detectar un incremento en los niveles de GFP-LC3II, alcanzándose un máximo de autofagia a los 30 minutos, que se mantiene constante a partir de este punto (Figura 6D). Es importante destacar además, el estrecho paralelismo entre las cinéticas de producción de ROS mitocondriales y de activación de autofagia en la CD tras la formación de la SI, puesto que los niveles de ROS alcanzan su máximo a los 15 minutos, momento en el cual tiene lugar la activación de la autofagia. Además, se observa también una ligera disminución en los niveles de ROS en el interior de la célula a partir de los 30 minutos, al alcanzarse la máxima activación de la autofagia (Figura 23).

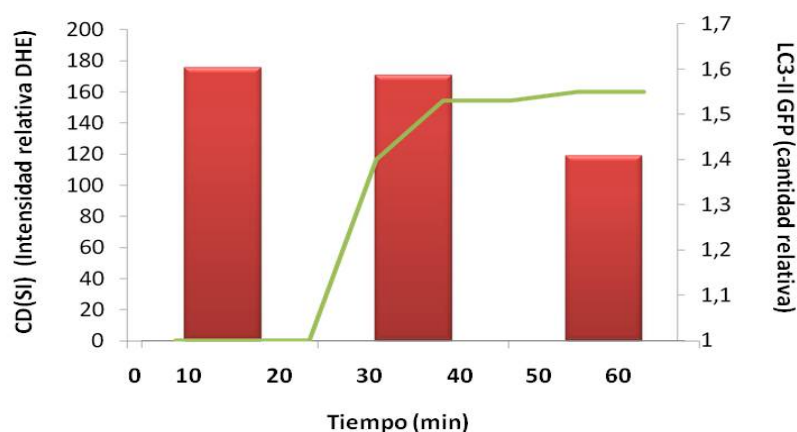


Figura 23: Cinéticas de producción de ROS y de inducción de autofagia en la CD tras la formación de la SI. Los datos obtenidos muestran la relación entre las cinéticas de ambos procesos en el interior de la célula. A los 15 minutos se observa ya el incremento en los niveles de ROS mitocondriales, pero no es hasta los 20-30 minutos cuando se produce la inducción de la autofagia, momento a partir del cual los niveles detectables de ROS en la célula comienzan a disminuir paulatinamente.

Nuestros resultados nos permitieron mostrar también, que la formación de la SI es capaz de inducir la autofagia en la CD de manera mucho más potente de la que lo hace un estímulo clásico de autofagia en modelos *in vitro* e *in vivo*, como es la privación de nutrientes (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005), en concreto de glucosa (Figura 7).

Una vez confirmada la existencia de autofagia en las CDs que se encontraban formando SI, quisimos analizar si éste era realmente el mecanismo de eliminación de las mitocondrias dañadas a consecuencia del incremento en la producción de ROS mitocondriales en estas células. Numerosos estudios previos han demostrado que la despolarización de la membrana mitocondrial desencadena la eliminación de la mitocondria por mitofagia (Twig and Shirihai 2011; Wang, Nartiss et al. 2012). Uno de

los mecanismos que induce mitofagia en las células de mamífero es la acumulación de la quinasa PINK1, una serina/treonina quinasa que contiene una secuencia específica de localización mitocondrial (Youle and Narendra 2011). En mitocondrias sanas, PINK1 es importada a su interior de manera constitutiva a través del complejo TIM/TOM presente en la membrana mitocondrial, donde se elimina por acción de diferentes proteasas de procesamiento mitocondrial (Narendra, Jin et al. 2010; Greene, Grenier et al. 2012). La pérdida del $\Delta\psi_m$ bloquea el transporte de PINK1 al interior de la mitocondria, permaneciendo en la membrana mitocondrial externa, donde actúa como marcador de daño mitocondrial. La acumulación de PINK1 induce la traslocación de Parkin, una ubiquitina E3 ligasa, desde el citoplasma a las mitocondrias dañadas, donde se encarga de promover la degradación de las mismas a través de la ubiquitinación de diferentes proteínas de la membrana externa mitocondrial (Matsuda, Sato et al. 2010; Okatsu, Saisho et al. 2010; Yoshii, Kishi et al. 2011; Lazarou, Jin et al. 2012; Wang, Nartiss et al. 2012). En línea con estos estudios, nuestros resultados confirmaron la existencia de mitofagia en la CD tras la formación de la SI, puesto que como se puede ver en la Figura 8B, se produce una acumulación tanto de PINK1 como de Parkina en la zona de contacto con el linfocito T en aquellas CDs que se encuentran formando sinapsis. Este hallazgo no excluye la posibilidad de la existencia de otras rutas autofágicas para la eliminación de las mitocondrias dañadas, pues en los últimos años se ha descrito la existencia de la proteína NIX (conocida también como BNIP3L), encargada de la eliminación de dichos orgánulos durante la maduración de eritrocitos, en situaciones de hipoxia o durante la embriogénesis (Sandoval, Thiagarajan et al. 2008; Ding, Ni et al. 2010; Kanki 2010).

Con el fin de analizar si la autofagia jugaba algún papel en el proceso mediante el cual la formación de la SI regula la producción de ROS, decidimos eliminarla selectivamente de las CDs mediante el sistema CD11C-Cre/Atg5^{flox/flox}, y posteriormente analizamos qué efecto tenía sobre los niveles de ROS en CDs aisladas o que forman SI (Figura 10). Se sabe que las CDs que carecen de la proteína Atg5 presentan defectos en el procesamiento de antígenos microbianos pero sin embargo, esta ausencia de autofagia no afecta a la maduración celular ni a la capacidad de las CDs para migrar ni para expresar moléculas coestimuladoras y MHCII en su membrana (Lee, Mattei et al. 2010). La caracterización de las CDs Atg5^{-/-} nos permitió confirmar que de acuerdo a los datos previos, las células no presentaban ninguna alteración en cuanto a su expresión en membrana de marcadores de maduración como CD86 o CCR7, marcadores de presentación antigénica como MHCII, o marcadores de linaje celular como CD4, CD8, CD11b o CD205 (Figura 11).

Existen evidencias experimentales previas que indican que la ausencia de Atg5 y por lo tanto de autofagia, ocasiona un aumento en el número de mitocondrias disfuncionales en el interior de la célula, hecho que se ha visto tanto en linfocitos T (Pua, Guo et al. 2009; Stephenson, Miller et al. 2009), como en fibroblastos (Tal, Sasai et al. 2009; Frank, Duvezin-Caubet et al. 2012) y células eritrocíticas (Mortensen, Ferguson et al. 2010). En consonancia con estos resultados previos, el análisis de las

muestras mediante microscopía confocal de fluorescencia y microscopía electrónica, mostró un importante incremento en el número de mitocondrias presentes en las CDs $\text{Atg5}^{-/-}$, lo que sugiere una deficiencia de mitofagia en las mismas (Figura 14).

Datos previos en la bibliografía indicaban un aumento o acumulación de ROS en células carente de autofagia debido a la acumulación de mitocondrias disfuncionales, así como también el desequilibrio en la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas (Zhang, Qi et al. 2007; Stephenson, Miller et al. 2009; Tal, Sasai et al. 2009). En concordancia con estos datos, nuestros resultados confirman un importante incremento de los niveles de ROS en las CDs $\text{Atg5}^{-/-}$ respecto a las CDs WT (Figura 13). Es importante destacar además, el hecho de que estos niveles de ROS presentes en las CDs $\text{Atg5}^{-/-}$ no se alteran tras la formación de la SI, sino que se mantienen en niveles similares durante todo el proceso. Por otro lado, el tratamiento de las CDs $\text{Atg5}^{-/-}$ con MitoQ, inhibiendo así la producción de ROS mitocondriales, producía un brusco descenso en los niveles de ROS en dichas células, confirmando así el origen mitocondrial de los mismos (Figura 15). Estos resultados en conjunto, confirman la importancia de la autofagia/mitofagia en la CD para la regulación de los niveles de ROS en la misma tras la formación de la SI, puesto que en las CDs $\text{Atg5}^{-/-}$ se producía una saturación de ROS que no podía ser incrementada tras la formación de la SI.

La autofagia se ha considerado tradicionalmente un mecanismo de inducción de supervivencia en las células antes situaciones de estrés (Kroemer and Levine 2008), pues la degradación de material citoplásmico en el interior de los autofagosomas permite proteger a la célula de la apoptosis, proporcionándole diversos sustratos metabólicos (Lum, Bauer et al. 2005). Sin embargo, se ha descrito también que la SI es capaz de inducir supervivencia en las CDs (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009). Debido a estos resultados previos existentes en la literatura, quisimos analizar si la autofagia era la responsable del efecto inductor de supervivencia que se observaba en las CDs tras la formación de la SI. Para ello llevamos a cabo experimentos de apoptosis en medio con ausencia de suero tanto con las CDs WT como con las CDs $\text{Atg5}^{-/-}$, analizando las modificaciones en la morfología del núcleo mediante tinción con Hoechst 33342. Estos ensayos nos permitieron determinar, que la apoptosis es mucho mayor en las CDs $\text{Atg5}^{-/-}$ que se encuentran solas, respecto a las CDs WT (Figura 16). Sin embargo, el análisis de las CDs que se encontraban formando SI reveló que las CDs $\text{Atg5}^{-/-}$ eran capaces de sobrevivir durante más tiempo. Estos resultados indican que la autofagia es un mecanismo de supervivencia en aquellas células que se encuentran solas, pero no se requiere para la inducción de la supervivencia que se observa tras la formación de la SI, siendo responsable de la misma en estas condiciones posiblemente la ruta Akt/mTOR (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009).

Dado que nuestros resultados hasta este momento nos indican que los ROS no regulan la autofagia en nuestro sistema, quisimos profundizar en el análisis del papel que ejercen en el interior de la CD puesto que cada vez existen más evidencias que apoyan su importancia como moduladores de las respuestas inmunes (Sareila, Kelkka et al. 2011; West, Shadel et al. 2011; Sena and Chandel 2012). Está ampliamente descrito

el papel de los ROS producidos por las NOX en la regulación de la respuesta de los linfocitos T (Sareila, Kelkka et al. 2011; Holmdahl, Sareila et al. 2013; Kotsias, Hoffmann et al. 2013), por lo que decidimos estudiar si los ROS de origen mitocondrial que estábamos viendo en el interior de la CD podían ejercer algún efecto sobre la activación y la proliferación del linfocito T.

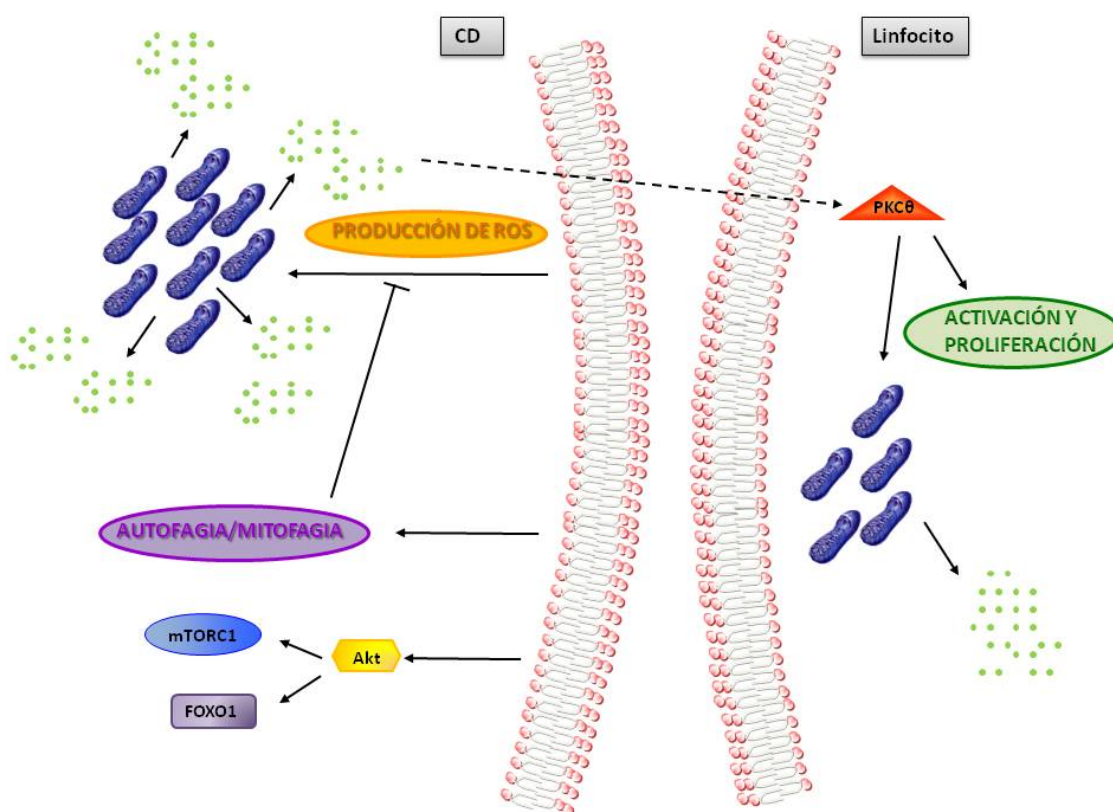
El análisis de los niveles de ROS en el linfocito T durante la formación de la SI, reveló la existencia de una estrecha relación de los mismos con los niveles de ROS mitocondriales presentes en el interior de la CD con la que se encuentra en contacto (Figura 17). Cabe destacar además, la cinética de aparición de estos ROS mitocondriales en ambas células, pues a tiempos cortos tras la formación de la SI (15 minutos) sólo se detectan en el interior de la CD, mientras que a tiempos más largos (30 minutos) los niveles de ROS son similares en ambas células. Del mismo modo, el mayor nivel de ROS que presentan las CDs *Atg5^{-/-}*, se ve reflejado en un aumento en los niveles de los mismos en aquellos linfocitos con los que se encuentran formando SI (Figura 19).

Debido a la gran importancia que se les da a las NOX en este contexto, y pese a que las CDs presentan bajos niveles de estas enzimas en su membrana en comparación con otras células del sistema inmune (Elsen, Doussiere et al. 2004), quisimos confirmar que los efectos que veíamos en el linfocito se debían a los ROS de origen mitocondrial que se estaban produciendo en el interior de la CD y no a los producidos por las NOX. Para ello bloqueamos la producción de ROS en la CD mediante el empleo de MitoQ y llevamos a cabo la formación de SI. Sorprendentemente, el análisis de las muestras nos permitió confirmar que los efectos observados en el linfocito T están mediados por los ROS de origen mitocondrial que se producen en la CD, puesto que al bloquear la producción de los mismos, tanto en las CDs WT como en las CDs *Atg5^{-/-}*, se ve una disminución de los niveles de ROS en el linfocito T, proporcional a la que se observa en las CDs (Figuras 18 y 20). En su conjunto, estos resultados sugieren que los ROS mitocondriales de las CDs controlan la aparición de ROS en los linfocitos.

Está ampliamente descrito que la adecuada activación y proliferación de los linfocitos T requiere un medio extracelular reducido, lo que se consigue gracias a la actividad de las CDs (Angelini, Gardella et al. 2002; Yan and Banerjee 2010; Martner, Aurelius et al. 2011). La activación del linfocito T por la CD está mediada por la estimulación del TCR y de la molécula co-estimuladora CD28, presentes en la membrana del linfocito. Esta estimulación desencadena la activación de diferentes rutas de señalización en el interior del linfocito, en las que participan numerosas quinasas, como ZAP-70, LAT, Lck o la fosfolipasa $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$). El reclutamiento de todas estas proteínas desencadena además, la activación de vías de señalización mediadas por Ras y por calcio en el interior del linfocito T (Yan and Banerjee 2010; Wang, Chuang et al. 2012).

Dado que habíamos visto que el aumento de los niveles de ROS en la CD producía un aumento en la activación y proliferación del linfocito T, quisimos estudiar cuál era el mecanismo a través del cual los ROS podían estar regulando la respuesta de

las células T. Una molécula clave en la señalización por TCR/CD28 es la quinasa PKC θ , la cual es indispensable para el desarrollo y la activación de los linfocitos T (Kaminski, Kiessling et al. 2007). Otra característica destacable de PKC θ en el contexto de este trabajo, es su presencia en la SI, concretamente en el cSMAC (Kong, Yokosuka et al. 2011). Así mismo, se sabe que tras la activación del linfocito T, PKC θ se trasloca también a la mitocondria, induciendo la producción de ROS (Kaminski, Kiessling et al. 2007). Por todo esto, decidimos investigar si PKC θ estaba mediando las respuestas que veíamos en el linfocito T, para lo cual analizamos si sus niveles de fosforilación se veían alterados al aumentar o disminuir los niveles de ROS en la CD. Los resultados de estos ensayos muestran que la fosforilación de PKC θ disminuye al bloquear la producción de ROS mitocondriales tanto en CDs WT como en CDs Atg5^{-/-} (Figura 21). Sorprendentemente, el análisis de otra molécula relacionada exclusivamente con la activación del TCR como es el caso de LAT, no reveló cambios significativos de fosforilación (Figura 21).



Modelo 1. Mecanismo de regulación de la activación y proliferación del linfocito T por la célula dendrítica. En este modelo se observa cómo la formación de la sinapsis inmunológica desencadena varios procesos en la CD. Se produce en primer lugar la relocalización de las mitocondrias en la zona próxima a la SI, desencadenándose la producción de ROS. Dichos ROS se ven a su vez regulados por la activación de un mecanismo de autofagia/mitofagia que permite el control de sus niveles para el correcto funcionamiento celular. La producción de estos ROS en la CD induce además, cambios en el interior del linfocito T que desencadenan la activación y proliferación de los mismos.

Quisimos comprobar si los diferentes niveles de ROS mitocondriales que presentaban las CDs WT respecto a las CDs Atg5^{-/-}, influían en la activación y proliferación de los linfocitos T. Para esto analizamos los niveles de CD69 que expresaban los linfocitos T tras 12 horas de SI y la proliferación de los mismos transcurridas 24 horas. Estos ensayos nos permitieron confirmar que el incremento en los niveles de ROS mitocondriales de la CD, se ve reflejado en un aumento tanto en la activación como en la proliferación de los linfocitos T (Figura 22). Estos resultados están en concordancia con datos previos publicados recientemente, en los que se muestra que la eliminación del gen Atg16 de las CDs, y por tanto la inhibición de la autofagia, produce un aumento significativo en la proliferación de los linfocitos T (Wildenberg, Vos et al. 2012).

En conjunto, estos resultados presentados apuntan a la existencia de un novedoso mecanismo de regulación de la activación y proliferación de los linfocitos T por acción de la CD (Modelo 1). Destaca el hecho además, de que los ROS producidos en la CD no parecen afectar a la señalización mediada por el TCR, sino que actúan modificando la actividad de PKC θ a través de la regulación de moléculas co-estimuladoras como es el caso de CD28. Desconocemos cómo se produce esta regulación o si es directa o indirecta, sin embargo, nuestros datos apuntan a una posible modificación de las moléculas de superficie presentes en el linfocito, o a una modificación del ambiente extracelular en la zona de la SI por acción de los ROS mitocondriales procedentes de la CD. El conocimiento de esta regulación de la actividad del linfocito mediada por las células dendríticas, podría ser importante para mejorar la comprensión de determinadas enfermedades inflamatorias como puede ser el lupus eritematoso (Perl, Nagy et al. 2004) o la artritis reumatoide (Griffiths 2005), que se encuentran asociadas a la presencia de elevados niveles de ROS en el interior del linfocito T.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones extraídas de los resultados obtenidos en este trabajo son las siguientes:

- 1) La formación de la SI entre un linfocito y una CD produce un incremento en los niveles de ROS en la CD, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 2) La mitocondria es la principal fuente productora de ROS en la CD tras la formación de la SI, puesto que el tratamiento de las CDs con MitoQ, un inhibidor selectivo de la cadena de transporte mitocondrial, bloquea la producción de ROS en estas células tras la formación de la SI.
- 3) Tras la formación de la SI las mitocondrias se redistribuyen en la CD, localizándose en la zona de contacto con el linfocito T.
- 4) El incremento en la producción de ROS mitocondriales inducido tras la formación de la SI en la CD desencadena un daño mitocondrial, que se refleja en una disminución del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) de la mitocondria.
- 5) La formación de la SI induce la activación de la autofagia y la mitofagia en la CD, lo que favorece la eliminación de las mitocondrias dañadas.
- 6) La formación de la SI induce un mecanismo de autofagia independiente de mTORC1.
- 7) La autofagia actúa regulando los niveles de ROS en la CD tras la formación de la SI, permitiendo el incremento de los mismos y que ejerzan así sus funciones de señalización.
- 8) Los linfocitos presentan niveles de ROS similares a los que tienen las CD tras la formación de la SI, existiendo una relación temporal de los niveles de los mismos entre ambas células.
- 9) Los ROS producidos en la CD a consecuencia de la formación de la SI pueden contribuir a la activación del linfocito T asociado, puesto que los cambios en los niveles de ROS en la CD se ven reflejados en cambios en los niveles de fosforilación de PKC θ , una quinasa que regula la activación del linfocito T.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Alwan, M. M., R. S. Liwski, et al. (2003). "Cutting edge: dendritic cell actin cytoskeletal polarization during immunological synapse formation is highly antigen-dependent." *J Immunol* **171**(9): 4479-4483.
- Al-Alwan, M. M., G. Rowden, et al. (2001). "The dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse." *J Immunol* **166**(3): 1452-1456.
- Alexander, A., S. L. Cai, et al. (2010). "ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(9): 4153-4158.
- Alexandropoulos, K. and N. M. Danzl (2012). "Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development." *Immunol Res*.
- Aliberti, J., C. Reis e Sousa, et al. (2000). "CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8[alpha]+ dendritic cells." *Nat Immunol* **1**(1): 83-87.
- Allenspach, E. J., P. Cullinan, et al. (2001). "ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse." *Immunity* **15**(5): 739-750.
- Angelini, G., S. Gardella, et al. (2002). "Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1491-1496.
- Ardavin, C. (1997). "Thymic dendritic cells." *Immunol Today* **18**(7): 350-361.
- Ashrafi, G. and T. L. Schwarz (2013). "The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria." *Cell Death Differ* **20**(1): 31-42.
- Asin-Cayuela, J., A. R. Manas, et al. (2004). "Fine-tuning the hydrophobicity of a mitochondria-targeted antioxidant." *FEBS Lett* **571**(1-3): 9-16.
- Bai, J., A. M. Rodriguez, et al. (1999). "Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury." *J Biol Chem* **274**(37): 26217-26224.
- aixauli, F., N. B. Martin-Cofreces, et al. (2011). "The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse." *EMBO J* **30**(7): 1238-1250.
- Bajenoff, M., S. Granjeaud, et al. (2003). "The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation." *J Exp Med* **198**(5): 715-724.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-252.
- Barnden M.J., Allison J. et al. (1998). "Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based α - and β -chain genes under the control of heterologous regulatory elements." *Immunol. Cell Biol.* **76**(1):34-40.
- Barreiro, O., H. de la Fuente, et al. (2007). "Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions." *Immunol Rev* **218**: 147-164.
- Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." *Physiol Rev* **87**(1): 245-313.
- Behrends, C., M. E. Sowa, et al. (2010). "Network organization of the human autophagy system." *Nature* **466**(7302): 68-76.
- Belz, G. T. and S. L. Nutt (2012). "Transcriptional programming of the dendritic cell network." *Nat Rev Immunol* **12**(2): 101-113.
- Belz, G. T., N. S. Wilson, et al. (2006). "Bone marrow-derived cells expand memory CD8+ T cells in response to viral infections of the lung and skin." *Eur J Immunol* **36**(2): 327-335.
- Bell, D., J. W. Young, et al. (1999). "Dendritic cells." *Adv Immunol* **72**: 255-324.
- Bernales, S., K. L. McDonald, et al. (2006). "Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response." *PLoS Biol* **4**(12): e423.

- Billadeau, D. D., J. C. Nolz, et al. (2007). "Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton." *Nat Rev Immunol* **7**(2): 131-143.
- Bloom, O., J. J. Untermaehrer, et al. (2008). "Spinophilin participates in information transfer at immunological synapses." *J Cell Biol* **181**(2): 203-211.
- Boes, M., J. Cerny, et al. (2002). "T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport." *Nature* **418**(6901): 983-988.
- Boisvert, J., S. Edmondson, et al. (2004). "Immunological synapse formation licenses CD40-CD40L accumulations at T-APC contact sites." *J Immunol* **173**(6): 3647-3652.
- Boya, P., R. A. Gonzalez-Polo, et al. (2005). "Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis." *Mol Cell Biol* **25**(3): 1025-1040.
- Bucana, C., I. Saiki, et al. (1986). "Uptake and accumulation of the vital dye hydroethidine in neoplastic cells." *J Histochem Cytochem* **34**(9): 1109-1115.
- Buonocore, G., S. Perrone, et al. (2010). "Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species." *Semin Fetal Neonatal Med* **15**(4): 186-190.
- Calvo, S. E. and V. K. Mootha (2010). "The mitochondrial proteome and human disease." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **11**: 25-44.
- Cao, J., J. Schulte, et al. (2009). "Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity." *EMBO J* **28**(10): 1505-1517.
- Cardaci, S., G. Filomeni, et al. (2012). "Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues." *J Cell Sci* **125**(Pt 9): 2115-2125.
- Castellani, P., G. Angelini, et al. (2008). "The thiol redox state of lymphoid organs is modified by immunization: role of different immune cell populations." *Eur J Immunol* **38**(9): 2419-2425.
- Caton, M. L., M. R. Smith-Raska, et al. (2007). "Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen." *J Exp Med* **204**(7): 1653-1664.
- Cemerski, S., J. Das, et al. (2007). "The stimulatory potency of T cell antigens is influenced by the formation of the immunological synapse." *Immunity* **26**(3): 345-355.
- Cervantes-Barragan, L., R. Zust, et al. (2007). "Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon." *Blood* **109**(3): 1131-1137.
- Cesta, M. F. (2006). "Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue." *Toxicol Pathol* **34**(5): 599-608.
- Cinamon, G., M. A. Zachariah, et al. (2008). "Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport." *Nat Immunol* **9**(1): 54-62.
- Cocheme, H. M., G. F. Kelso, et al. (2007). "Mitochondrial targeting of quinones: therapeutic implications." *Mitochondrion* **7 Suppl**: S94-102.
- Contento, R. L., S. Campello, et al. (2010). "Adhesion shapes T cells for prompt and sustained T-cell receptor signalling." *EMBO J* **29**(23): 4035-4047.
- Contento, R. L., B. Molon, et al. (2008). "CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29): 10101-10106.
- Cuervo, A. M. (2010). "Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off." *Trends Endocrinol Metab* **21**(3): 142-150.
- Cuervo, A. M. (2010). "The plasma membrane brings autophagosomes to life." *Nat Cell Biol* **12**(8): 735-737.
- Curtin, J. F., M. Donovan, et al. (2002). "Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis." *J Immunol Methods* **265**(1-2): 49-72.
- Chan, D. C. (2006). "Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development." *Cell* **125**(7): 1241-1252.
- Chance, B., H. Sies, et al. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." *Physiol Rev* **59**(3): 527-605.
- Chen, Y., M. B. Azad, et al. (2009). "Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy." *Cell Death Differ* **16**(7): 1040-1052.

- Cheng, G., Z. Cao, et al. (2001). "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." *Gene* **269**(1-2): 131-140.
- Cheng, G., D. Ritsick, et al. (2004). "Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox." *J Biol Chem* **279**(33): 34250-34255.
- Cheong, C., I. Matos, et al. (2010). "Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas." *Cell* **143**(3): 416-429.
- Choi, S. L., S. J. Kim, et al. (2001). "The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂." *Biochem Biophys Res Commun* **287**(1): 92-97.
- De Duve, C. and H. Beaufay (1959). "Tissue fractionation studies. 10. Influence of ischaemia on the state of some bound enzymes in rat liver." *Biochem J* **73**: 610-616.
- de Keizer, P. L., B. M. Burgering, et al. (2011). "Forkhead box o as a sensor, mediator, and regulator of redox signaling." *Antioxid Redox Signal* **14**(6): 1093-1106.
- den Haan, J. M. and M. J. Bevan (2002). "Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **196**(6): 817-827.
- Deretic, V. (2012). "Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors." *Curr Opin Immunol* **24**(1): 21-31.
- Ding, W. X., H. M. Ni, et al. (2010). "Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming." *J Biol Chem* **285**(36): 27879-27890.
- Drayton, D. L., S. Liao, et al. (2006). "Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis." *Nat Immunol* **7**(4): 344-353.
- Drinker, C. K., M. E. Field, et al. (1934). "The Filtering Capacity of Lymph Nodes." *J Exp Med* **59**(4): 393-405.
- Duchen, M. R. and G. Szabadkai (2010). "Roles of mitochondria in human disease." *Essays Biochem* **47**: 115-137.
- Dunn, W. A., Jr., J. M. Cregg, et al. (2005). "Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes." *Autophagy* **1**(2): 75-83.
- Dustin, M. L. (2009). "The cellular context of T cell signaling." *Immunity* **30**(4): 482-492.
- Dustin, M. L., S. K. Bromley, et al. (1997). "Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3909-3913.
- Dustin, M. L., S. Y. Tseng, et al. (2006). "T cell-dendritic cell immunological synapses." *Curr Opin Immunol* **18**(4): 512-516.
- Efeyan, A. and D. M. Sabatini (2010). "mTOR and cancer: many loops in one pathway." *Curr Opin Cell Biol* **22**(2): 169-176.
- Egen, J. G. and J. P. Allison (2002). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength." *Immunity* **16**(1): 23-35.
- Eibert, S. M., K. H. Lee, et al. (2004). "Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(7): 1957-1962.
- El Benna, J., G. Hayem, et al. (2002). "NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy." *Inflammation* **26**(6): 273-278.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Elsen, S., J. Doussiere, et al. (2004). "Cryptic O₂-generating NADPH oxidase in dendritic cells." *J Cell Sci* **117**(Pt 11): 2215-2226.
- Emerling, B. M., F. Weinberg, et al. (2009). "Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio." *Free Radic Biol Med* **46**(10): 1386-1391.
- Eng, K. E., M. D. Panas, et al. (2010). "A novel quantitative flow cytometry-based assay for autophagy." *Autophagy* **6**(5): 634-641.

- Eskelinen, E. L. (2008). "New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells." *Int Rev Cell Mol Biol* **266**: 207-247.
- Eun, S. Y., B. P. O'Connor, et al. (2006). "Cutting edge: rho activation and actin polarization are dependent on plexin-A1 in dendritic cells." *J Immunol* **177**(7): 4271-4275.
- Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." *Science* **272**(5258): 50-53.
- Filomeni, G., E. Desideri, et al. (2010). "Under the ROS...thiol network is the principal suspect for autophagy commitment." *Autophagy* **6**(7): 999-1005.
- Finkel, T. (2011). "Signal transduction by reactive oxygen species." *J Cell Biol* **194**(1): 7-15.
- Fisher, P. J., P. A. Bulur, et al. (2008). "Dendritic cell microvilli: a novel membrane structure associated with the multifocal synapse and T-cell clustering." *Blood* **112**(13): 5037-5045.
- Fogg, D. K., C. Sibon, et al. (2006). "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells." *Science* **311**(5757): 83-87.
- Fooksman, D. R., S. R. Shaikh, et al. (2009). "Cutting edge: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate concentration at the APC side of the immunological synapse is required for effector T cell function." *J Immunol* **182**(9): 5179-5182.
- Fooksman, D. R., S. Vardhana, et al. (2010). "Functional anatomy of T cell activation and synapse formation." *Annu Rev Immunol* **28**: 79-105.
- Frank, M., S. Duvezin-Caubet, et al. (2012). "Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner." *Biochim Biophys Acta* **1823**(12): 2297-2310.
- Freiberg, B. A., H. Kupfer, et al. (2002). "Staging and resetting T cell activation in SMACs." *Nat Immunol* **3**(10): 911-917.
- Friedl, P., A. T. den Boer, et al. (2005). "Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse." *Nat Rev Immunol* **5**(7): 532-545.
- Funderburk, S. F., Q. J. Wang, et al. (2010). "The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond." *Trends Cell Biol* **20**(6): 355-362.
- Geisler, S., K. M. Holmstrom, et al. (2010). "PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1." *Nat Cell Biol* **12**(2): 119-131.
- Geissmann, F., M. G. Manz, et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* **327**(5966): 656-661.
- Gomes, L. C. and L. Scorrano (2013). "Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy." *Biochim Biophys Acta* **1833**(1): 205-212.
- Gordon, J. and N. R. Manley (2011). "Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis." *Development* **138**(18): 3865-3878.
- Gorlach, A., R. P. Brandes, et al. (2000). "A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall." *Circ Res* **87**(1): 26-32.
- Gottlieb, R. A. and R. S. Carreira (2010). "Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life." *Am J Physiol Cell Physiol* **299**(2): C203-210.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2009). "Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53." *Nature* **458**(7242): 1127-1130.
- Green, D. R., L. Galluzzi, et al. (2011). "Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging." *Science* **333**(6046): 1109-1112.
- Green, J. M., V. Karpitskiy, et al. (2000). "Coordinate regulation of T cell activation by CD2 and CD28." *J Immunol* **164**(7): 3591-3595.
- Greene, A. W., K. Grenier, et al. (2012). "Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment." *EMBO Rep* **13**(4): 378-385.
- Griffiths, H. R. (2005). "ROS as signalling molecules in T cells--evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis." *Redox Rep* **10**(6): 273-280.

- Grouard, G., M. C. Rissoan, et al. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." *J Exp Med* **185**(6): 1101-1111.
- Gunzer, M., A. Schafer, et al. (2000). "Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential." *Immunity* **13**(3): 323-332.
- Hailey, D. W., A. S. Rambold, et al. (2010). "Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation." *Cell* **141**(4): 656-667.
- Han, D., F. Antunes, et al. (2003). "Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol." *J Biol Chem* **278**(8): 5557-5563.
- Hara T., Nakamura K. et al. (2006). "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice". *Nature* **441**(7095):885-9.
- Hara, T., A. Takamura, et al. (2008). "FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells." *J Cell Biol* **181**(3): 497-510.
- Harrison, R. (2002). "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?" *Free Radic Biol Med* **33**(6): 774-797.
- He, C. and D. J. Klionsky (2009). "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." *Annu Rev Genet* **43**: 67-93.
- Heath, W. R., G. T. Belz, et al. (2004). "Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens." *Immunol Rev* **199**: 9-26.
- Henri, S., D. Vremec, et al. (2001). "The dendritic cell populations of mouse lymph nodes." *J Immunol* **167**(2): 741-748.
- Heymes, C., J. K. Bendall, et al. (2003). "Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure." *J Am Coll Cardiol* **41**(12): 2164-2171.
- Hochrein, H. and M. O'Keeffe (2008). "Dendritic cell subsets and toll-like receptors." *Handb Exp Pharmacol*(183): 153-179.
- Holdorf A.D., Lee K.H. et al. (2002). "Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse." *Nat. Immunol.* **3**(3):259-64
- Holmdahl, R., O. Sareila, et al. (2012). "Hydrogen Peroxide As an Immunological Transmitter Regulating Autoreactive T Cells." *Antioxid Redox Signal.*
- Huang, J., G. Y. Lam, et al. (2011). "Autophagy signaling through reactive oxygen species." *Antioxid Redox Signal* **14**(11): 2215-2231.
- Hughes, T. and T. E. Rusten (2007). "Origin and evolution of self-consumption: autophagy." *Adv Exp Med Biol* **607**: 111-118.
- Huppa, J. B., M. Gleimer, et al. (2003). "Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential." *Nat Immunol* **4**(8): 749-755.
- Itakura, E. and N. Mizushima (2011). "p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding." *J Cell Biol* **192**(1): 17-27.
- Ivankovic-Dikic, I., E. Gronroos, et al. (2000). "Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins." *Nat Cell Biol* **2**(9): 574-581.
- Jager, S., C. Bucci, et al. (2004). "Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles." *J Cell Sci* **117**(Pt 20): 4837-4848.
- Javesghani, D., S. A. Magder, et al. (2002). "Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles." *Am J Respir Crit Care Med* **165**(3): 412-418.
- Jendrysik, M. A., S. Vasilevsky, et al. (2011). "NADPH oxidase-2 derived ROS dictates murine DC cytokine-mediated cell fate decisions during CD4 T helper-cell commitment." *PLoS One* **6**(12): e28198.
- Jung, C. H., C. B. Jun, et al. (2009). "ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery." *Mol Biol Cell* **20**(7): 1992-2003.
- Jung, Y. J., S. Y. Woo, et al. (2002). "Functional maturation of myeloid cells during in vitro differentiation from human cord blood CD34+ cells." *Haematologica* **87**(11): 1222-1223.

- Junt, T., E. A. Moseman, et al. (2007). "Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells." *Nature* **450**(7166): 110-114.
- Kaminski, M., M. Kiessling, et al. (2007). "Novel role for mitochondria: protein kinase C θ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death." *Mol Cell Biol* **27**(10): 3625-3639.
- Kang, R., H. J. Zeh, et al. (2011). "The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis." *Cell Death Differ* **18**(4): 571-580.
- Kanki, T. (2010). "Nix, a receptor protein for mitophagy in mammals." *Autophagy* **6**(3): 433-435.
- Kao, Y. Y., D. Gianni, et al. (2008). "Identification of a conserved Rac-binding site on NADPH oxidases supports a direct GTPase regulatory mechanism." *J Biol Chem* **283**(19): 12736-12746.
- Katakai, T., T. Hara, et al. (2004). "Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes." *J Exp Med* **200**(6): 783-795.
- Katakai, T., H. Suto, et al. (2008). "Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs." *J Immunol* **181**(9): 6189-6200.
- Keller, A. M., T. A. Groothuis, et al. (2007). "Costimulatory ligand CD70 is delivered to the immunological synapse by shared intracellular trafficking with MHC class II molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 5989-5994.
- Kelso, G. F., C. M. Porteous, et al. (2001). "Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties." *J Biol Chem* **276**(7): 4588-4596.
- Khan, A. A., C. Bose, et al. (2001). "Physiological regulation of the immunological synapse by agrin." *Science* **292**(5522): 1681-1686.
- Kim, J., W. P. Huang, et al. (2002). "Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation." *J Biol Chem* **277**(1): 763-773.
- Kim, Y. J., W. S. Lee, et al. (2006). "Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex." *Cancer Res* **66**(14): 7136-7142.
- Klareskog, L., U. Tjernlund, et al. (1977). "Epidermal Langerhans cells express Ia antigens." *Nature* **268**(5617): 248-250.
- Klionsky, D. J. (2007). "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(11): 931-937.
- Kong, K. F., T. Yokosuka, et al. (2011). "A motif in the V3 domain of the kinase PKC- θ determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28." *Nat Immunol* **12**(11): 1105-1112.
- Kool, M., T. Soullie, et al. (2008). "Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells." *J Exp Med* **205**(4): 869-882.
- Kotsias, F., E. Hoffmann, et al. (2012). "Reactive Oxygen Species Production in the Phagosome: Impact on Antigen Presentation in Dendritic Cells." *Antioxid Redox Signal*.
- Kraft, C. and M. Peter (2008). "Is the Rsp5 ubiquitin ligase involved in the regulation of ribophagy?" *Autophagy* **4**(6): 838-840.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol Rev* **87**(1): 99-163.
- Kroemer, G. and B. Levine (2008). "Autophagic cell death: the story of a misnomer." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(12): 1004-1010.
- Kroemer, G., G. Marino, et al. (2010). "Autophagy and the integrated stress response." *Mol Cell* **40**(2): 280-293.
- Kurihara, Y., T. Kanki, et al. (2012). "Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial

- DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast." *J Biol Chem* **287**(5): 3265-3272.
- Lazarou, M., S. M. Jin, et al. (2012). "Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin." *Dev Cell* **22**(2): 320-333.
- Lee, J., S. Giordano, et al. (2012). "Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling." *Biochem J* **441**(2): 523-540.
- Lee, H. K., L. M. Mattei, et al. (2010). "In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells." *Immunity* **32**(2): 227-239.
- Lee, K. H., A. R. Dinner, et al. (2003). "The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation." *Science* **302**(5648): 1218-1222.
- Lee, I. H., L. Cao, et al. (2008). "A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(9): 3374-3379.
- Lee, S. B., S. Kim, et al. (2007). "ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase." *EMBO Rep* **8**(4): 360-365.
- Lemasters, J. J. (2005). "Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging." *Rejuvenation Res* **8**(1): 3-5.
- Leon, B., M. Lopez-Bravo, et al. (2007). "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania." *Immunity* **26**(4): 519-531.
- Li, Y., Y. Zhao, et al. (2012). "A novel ER-localized transmembrane protein, EMC6, interacts with RAB5A and regulates cell autophagy." *Autophagy* **9**(2).
- Lioudyno, M. I., J. A. Kozak, et al. (2008). "Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(6): 2011-2016.
- Lipinski, M. M., G. Hoffman, et al. (2010). "A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions." *Dev Cell* **18**(6): 1041-1052.
- Litman, G. W., J. P. Rast, et al. (2010). "The origins of vertebrate adaptive immunity." *Nat Rev Immunol* **10**(8): 543-553.
- Liu, K., G. D. Victora, et al. (2009). "In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis." *Science* **324**(5925): 392-397.
- Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." *Annu Rev Immunol* **23**: 275-306.
- Loo, D. T. and J. R. Rillema (1998). "Measurement of cell death." *Methods Cell Biol* **57**: 251-264.
- Lopez-Huertas, M. R., E. Mateos, et al. (2011). "Protein kinase Ctheta is a specific target for inhibition of the HIV type 1 replication in CD4+ T lymphocytes." *J Biol Chem* **286**(31): 27363-27377.
- Lum, J. J., D. E. Bauer, et al. (2005). "Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis." *Cell* **120**(2): 237-248.
- Luty, W. H., D. Rodeberg, et al. (2007). "Antiparallel segregation of notch components in the immunological synapse directs reciprocal signaling in allogeneic Th:DC conjugates." *J Immunol* **179**(2): 819-829.
- Lutz M.B., Kukutsch N., Ogilvie A.L., et al. (1999). "An advance culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow." *J. Immunol. Methods* **223**(1): 77-92
- Maldonado, R. A., D. J. Irvine, et al. (2004). "A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes." *Nature* **431**(7008): 527-532.
- Maldonado, R. A., M. A. Soriano, et al. (2009). "Control of T helper cell differentiation through cytokine receptor inclusion in the immunological synapse." *J Exp Med* **206**(4): 877-892.

- Mammucari, C., M. Patron, et al. (2011). "Molecules and roles of mitochondrial calcium signaling." *Biofactors* **37**(3): 219-227.
- Martner, A., J. Aurelius, et al. (2011). "Redox remodeling by dendritic cells protects antigen-specific T cells against oxidative stress." *J Immunol* **187**(12): 6243-6248.
- Matheu M.P., Sen D., Cahalan M.D., Parker I. (2008). "Generation of bone marrow derived murine dendritic cells for use in 2-photon imaging". *J Vis Exp* **9**(17): pii:773. Doi:10.3791/773.
- Matsuda, N., S. Sato, et al. (2010). "PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy." *J Cell Biol* **189**(2): 211-221.
- May, A. I., R. J. Devenish, et al. (2012). "The many faces of mitochondrial autophagy: making sense of contrasting observations in recent research." *Int J Cell Biol* **2012**: 431684.
- McDonnell, A. M., A. C. Prosser, et al. (2010). "CD8alpha+ DC are not the sole subset cross-presenting cell-associated tumor antigens from a solid tumor." *Eur J Immunol* **40**(6): 1617-1627.
- Mebius, R. E. and G. Kraal (2005). "Structure and function of the spleen." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 606-616.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." *Nat Rev Immunol* **1**(2): 135-145.
- Mehrpour, M., A. Esclatine, et al. (2010). "Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview." *Am J Physiol Cell Physiol* **298**(4): C776-785.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson, et al. (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." *Nature* **427**(6970): 154-159.
- Mercier, F. E., C. Ragu, et al. (2012). "The bone marrow at the crossroads of blood and immunity." *Nat Rev Immunol* **12**(1): 49-60.
- Meredith, M. M., K. Liu, et al. (2012). "Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage." *J Exp Med* **209**(6): 1153-1165.
- Miller, M. J., A. S. Hejazi, et al. (2004). "T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(4): 998-1003.
- Miller, M. J., O. Safrina, et al. (2004). "Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes." *J Exp Med* **200**(7): 847-856.
- Miller, M. J., S. H. Wei, et al. (2003). "Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2604-2609.
- Miller, M. J., S. H. Wei, et al. (2002). "Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node." *Science* **296**(5574): 1869-1873.
- Mizushima, N. (2004). "Methods for monitoring autophagy." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(12): 2491-2502.
- Mizushima, N. and D. J. Klionsky (2007). "Protein turnover via autophagy: implications for metabolism." *Annu Rev Nutr* **27**: 19-40.
- Mizushima N., Yamamoto A. et al. (2004). "In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker". *Mol. Biol. Cell*. **15**(3):1101-11.
- Mizushima, N., B. Levine, et al. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." *Nature* **451**(7182): 1069-1075.
- Mizushima, N., T. Noda, et al. (1998). "A protein conjugation system essential for autophagy." *Nature* **395**(6700): 395-398.
- Mizushima, N., Y. Ohsumi, et al. (2002). "Autophagosome formation in mammalian cells." *Cell Struct Funct* **27**(6): 421-429.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, et al. (2010). "Methods in mammalian autophagy research." *Cell* **140**(3): 313-326.

- Morselli, E., M. C. Maiuri, et al. (2010). "Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy." *Cell Death Dis* **1**: e10.
- Mortensen, M., D. J. Ferguson, et al. (2010). "Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(2): 832-837.
- Muller, F. L., Y. Liu, et al. (2004). "Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane." *J Biol Chem* **279**(47): 49064-49073.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* **417**(1): 1-13.
- Naik, S. H., D. Metcalf, et al. (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." *Nat Immunol* **7**(6): 663-671.
- Naik, S. H., P. Sathe, et al. (2007). "Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo." *Nat Immunol* **8**(11): 1217-1226.
- Nakamura, H., H. Masutani, et al. (2006). "Extracellular thioredoxin and thioredoxin-binding protein 2 in control of cancer." *Semin Cancer Biol* **16**(6): 444-451.
- Narendra, D. P., S. M. Jin, et al. (2010). "PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin." *PLoS Biol* **8**(1): e1000298.
- Narendra, D. P. and R. J. Youle (2011). "Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control." *Antioxid Redox Signal* **14**(10): 1929-1938.
- Narni-Mancinelli, E., L. Campisi, et al. (2007). "Memory CD8+ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI+ phagocytes." *J Exp Med* **204**(9): 2075-2087.
- Nauseef, W. M. (2008). "Biological roles for the NOX family NADPH oxidases." *J Biol Chem* **283**(25): 16961-16965.
- Nauseef, W. M. (2008). "Nox enzymes in immune cells." *Semin Immunopathol* **30**(3): 195-208.
- Nedjic, J., M. Aichinger, et al. (2008). "Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance." *Nature* **455**(7211): 396-400.
- Novak, I., V. Kirkin, et al. (2010). "Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance." *EMBO Rep* **11**(1): 45-51.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, et al. (2002). "Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus." *J Exp Med* **196**(10): 1307-1319.
- O'Shea, J. J., J. A. Johnston, et al. (2001). "Key molecules involved in receptor-mediated lymphocyte activation." *Curr Protoc Immunol* **Chapter 11**: Unit 11 19A.
- Ochsenbein, A. F., T. Fehr, et al. (1999). "Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies." *Science* **286**(5447): 2156-2159.
- Okamoto, K., N. Kondo-Okamoto, et al. (2009). "Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy." *Dev Cell* **17**(1): 87-97.
- Okatsu, K., K. Saisho, et al. (2010). "p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria." *Genes Cells* **15**(8): 887-900.
- Onai, N., A. Obata-Onai, et al. (2007). "Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow." *Nat Immunol* **8**(11): 1207-1216.
- Park, S. Y., X. Yu, et al. (2007). "Peroxisome 1 interacts with androgen receptor and enhances its transactivation." *Cancer Res* **67**(19): 9294-9303.
- Paul, W. E. and R. A. Seder (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." *Cell* **76**(2): 241-251.
- Pentcheva-Hoang, T., J. G. Egen, et al. (2004). "B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse." *Immunity* **21**(3): 401-413.
- Perl, A., G. Nagy, et al. (2004). "Apoptosis and mitochondrial dysfunction in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus." *Methods Mol Med* **102**: 87-114.
- Petry, A., M. Weitnauer, et al. (2010). "Receptor activation of NADPH oxidases." *Antioxid Redox Signal* **13**(4): 467-487.

- Piccoli, C., R. Ria, et al. (2005). "Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity." *J Biol Chem* **280**(28): 26467-26476.
- Pooley, J. L., W. R. Heath, et al. (2001). "Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells." *J Immunol* **166**(9): 5327-5330.
- Pua, H. H., J. Guo, et al. (2009). "Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes." *J Immunol* **182**(7): 4046-4055.
- Quah, B. J., H. S. Warren, et al. (2007). "Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester." *Nat Protoc* **2**(9): 2049-2056.
- Quintana, A., C. Schwindling, et al. (2007). "T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(36): 14418-14423.
- Rada, B., C. Hably, et al. (2008). "Role of Nox2 in elimination of microorganisms." *Semin Immunopathol* **30**(3): 237-253.
- Rada, B. and T. L. Leto (2008). "Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases." *Contrib Microbiol* **15**: 164-187.
- Reinehr, R., S. Becker, et al. (2005). "Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis." *J Biol Chem* **280**(29): 27179-27194.
- Reis e Sousa, C., S. Hieny, et al. (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." *J Exp Med* **186**(11): 1819-1829.
- Reizis, B. (2012). "Classical dendritic cells as a unique immune cell lineage." *J Exp Med* **209**(6): 1053-1056.
- Reizis, B., M. Colonna, et al. (2011). "Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system?" *Nat Rev Immunol* **11**(8): 558-565.
- Revy, P., M. Sospedra, et al. (2001). "Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells." *Nat Immunol* **2**(10): 925-931.
- Riol-Blanco, L., C. Delgado-Martin, et al. (2009). "Immunological synapse formation inhibits, via NF-kappaB and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells." *Nat Immunol* **10**(7): 753-760.
- Robinson, K. M., M. S. Janes, et al. (2006). "Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(41): 15038-15043.
- Rodewald, H. R. (2008). "Thymus organogenesis." *Annu Rev Immunol* **26**: 355-388.
- Rowden, G., M. G. Lewis, et al. (1977). "Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells." *Nature* **268**(5617): 247-248.
- Sahu, R., S. Kaushik, et al. (2011). "Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes." *Dev Cell* **20**(1): 131-139.
- Saito, T. and T. Yokosuka (2006). "Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells." *Curr Opin Immunol* **18**(3): 305-313.
- Sallusto, F., M. Cella, et al. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* **182**(2): 389-400.
- Sandoval, H., P. Thiagarajan, et al. (2008). "Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells." *Nature* **454**(7201): 232-235.
- Saraste, A. and K. Pulkki (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." *Cardiovasc Res* **45**(3): 528-537.
- Sareila, O., T. Kelkka, et al. (2011). "NOX2 complex-derived ROS as immune regulators." *Antioxid Redox Signal* **15**(8): 2197-2208.

- Satpathy, A. T., W. Kc, et al. (2012). "Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages." *J Exp Med* **209**(6): 1135-1152.
- Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar (2011). "Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology." *Trends Biochem Sci* **36**(1): 30-38.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, et al. (2007). "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4." *EMBO J* **26**(7): 1749-1760.
- Schluns, K. S. and L. Lefrancois (2003). "Cytokine control of memory T-cell development and survival." *Nat Rev Immunol* **3**(4): 269-279.
- Shvets, E. and Z. Elazar (2009). "Flow cytometric analysis of autophagy in living mammalian cells." *Methods Enzymol* **452**: 131-141.
- Sena, L. A. and N. S. Chandel (2012). "Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species." *Mol Cell* **48**(2): 158-167.
- Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, et al. (2003). "TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection." *Immunity* **19**(1): 59-70.
- Serrano, F., N. S. Kolluri, et al. (2003). "NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain." *Brain Res* **988**(1-2): 193-198.
- Shaid, S., C. H. Brandts, et al. (2013). "Ubiquitination and selective autophagy." *Cell Death Differ* **20**(1): 21-30.
- Simonsen, A. and S. A. Tooze (2009). "Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes." *J Cell Biol* **186**(6): 773-782.
- Smith, R. A., R. C. Hartley, et al. (2012). "Mitochondrial pharmacology." *Trends Pharmacol Sci* **33**(6): 341-352.
- Smith, R. A. and M. P. Murphy (2010). "Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ." *Ann N Y Acad Sci* **1201**: 96-103.
- St-Pierre, J., S. Drori, et al. (2006). "Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators." *Cell* **127**(2): 397-408.
- Steinman, R. M. and J. Banchereau (2007). "Taking dendritic cells into medicine." *Nature* **449**(7161): 419-426.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* **137**(5): 1142-1162.
- Stephenson, L. M., B. C. Miller, et al. (2009). "Identification of Atg5-dependent transcriptional changes and increases in mitochondrial mass in Atg5-deficient T lymphocytes." *Autophagy* **5**(5): 625-635.
- Stinchcombe, J. C., G. Bossi, et al. (2001). "The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges." *Immunity* **15**(5): 751-761.
- Stoll, S., J. Delon, et al. (2002). "Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes." *Science* **296**(5574): 1873-1876.
- Sumpter, R., Jr. and B. Levine (2010). "Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning." *Semin Cell Dev Biol* **21**(7): 699-711.
- Sun, Z., C. W. Arendt, et al. (2000). "PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes." *Nature* **404**(6776): 402-407.
- Takahashi, Y., C. L. Meyerkord, et al. (2011). "Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy." *Autophagy* **7**(1): 61-73.
- Tal, M. C., M. Sasai, et al. (2009). "Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2770-2775.
- Tang, D., R. Kang, et al. (2010). "Endogenous HMGB1 regulates autophagy." *J Cell Biol* **190**(5): 881-892.
- Tanida, I. (2011). "Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy." *Antioxid Redox Signal* **14**(11): 2201-2214.

- Tanida, I., N. Minematsu-Ikeguchi, et al. (2005). "Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy." *Autophagy* **1**(2): 84-91.
- Tanida, I., T. Ueno, et al. (2004). "Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes." *J Biol Chem* **279**(46): 47704-47710.
- Tooze, S. A. and T. Yoshimori (2010). "The origin of the autophagosomal membrane." *Nat Cell Biol* **12**(9): 831-835.
- Tordjman, R., Y. Lepelletier, et al. (2002). "A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response." *Nat Immunol* **3**(5): 477-482.
- Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." *Annu Rev Immunol* **23**: 975-1028.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Physiol* **552**(Pt 2): 335-344.
- Twig, G. and O. S. Shirihai (2011). "The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy." *Antioxid Redox Signal* **14**(10): 1939-1951.
- Ueno, N., R. Takeya, et al. (2005). "The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators." *J Biol Chem* **280**(24): 23328-23339.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(1): 44-84.
- Ventura-Clapier, R., A. Garnier, et al. (2008). "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha." *Cardiovasc Res* **79**(2): 208-217.
- Vicente-Manzanares, M. and F. Sanchez-Madrid (2004). "Role of the cytoskeleton during leukocyte responses." *Nat Rev Immunol* **4**(2): 110-122.
- Virgin, H. W. and B. Levine (2009). "Autophagy genes in immunity." *Nat Immunol* **10**(5): 461-470.
- Vives-Bauza, C., C. Zhou, et al. (2010). "PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(1): 378-383.
- Vondenhoff, M. F., G. Kraal, et al. (2007). "Lymphoid organogenesis in brief." *Eur J Immunol* **37 Suppl 1**: S46-52.
- Vremec, D., J. Pooley, et al. (2000). "CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen." *J Immunol* **164**(6): 2978-2986.
- Vyas, J. M., Y. M. Kim, et al. (2007). "Tubulation of class II MHC compartments is microtubule dependent and involves multiple endolysosomal membrane proteins in primary dendritic cells." *J Immunol* **178**(11): 7199-7210.
- Wallace, D. C., W. Fan, et al. (2010). "Mitochondrial energetics and therapeutics." *Annu Rev Pathol* **5**: 297-348.
- Wang, K. and D. J. Klionsky (2011). "Mitochondria removal by autophagy." *Autophagy* **7**(3): 297-300.
- Wang, Y., K. Shibuya, et al. (2008). "LFA-1 decreases the antigen dose for T cell activation in vivo." *Int Immunol* **20**(9): 1119-1127.
- Wang, Y., Y. Nartiss, et al. (2012). "ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy." *Autophagy* **8**(10): 1462-1476.
- Wang, X., H. C. Chuang, et al. (2012). "Regulation of PKC-theta function by phosphorylation in T cell receptor signaling." *Front Immunol* **3**: 197.
- Wei, S. H., I. Parker, et al. (2003). "A stochastic view of lymphocyte motility and trafficking within the lymph node." *Immunol Rev* **195**: 136-159.
- Wen, S. T. and R. A. Van Etten (1997). "The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity." *Genes Dev* **11**(19): 2456-2467.

- West, A. P., G. S. Shadel, et al. (2011). "Mitochondria in innate immune responses." Nat Rev Immunol **11**(6): 389-402.
- Westermann, B. (2010). "Mitochondrial fusion and fission in cell life and death." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 872-884.
- Wetzel, S. A., T. W. McKeithan, et al. (2002). "Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation." J Immunol **169**(11): 6092-6101.
- Wildenberg, M. E., A. C. Vos, et al. (2012). "Autophagy attenuates the adaptive immune response by destabilizing the immunologic synapse." Gastroenterology **142**(7): 1493-1503 e1496.
- Wilson, N. S., D. El-Sukkari, et al. (2003). "Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature." Blood **102**(6): 2187-2194.
- Xie, Z., U. Nair, et al. (2008). "Dissecting autophagosome formation: the missing pieces." Autophagy **4**(7): 920-922.
- Yan, Z. and R. Banerjee (2010). "Redox remodeling as an immunoregulatory strategy." Biochemistry **49**(6): 1059-1066.
- Yan, Z., S. K. Garg, et al. (2009). "Extracellular redox modulation by regulatory T cells." Nat Chem Biol **5**(10): 721-723.
- Yoshii, S. R., C. Kishi, et al. (2011). "Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane." J Biol Chem **286**(22): 19630-19640.
- Youle, R. J. and D. P. Narendra (2011). "Mechanisms of mitophagy." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(1): 9-14.
- Young, I. S. and J. V. Woodside (2001). "Antioxidants in health and disease." J Clin Pathol **54**(3): 176-186.
- Zammit, D. J., L. S. Cauley, et al. (2005). "Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection." Immunity **22**(5): 561-570.
- Zhang, Y., H. Qi, et al. (2007). "The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains." Autophagy **3**(4): 337-346.
- Zhang, W., R. P. Tribble, et al. (2000). "Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling." J Biol Chem **275**(30): 23355-23361.

ABREVIATURAS



- **ADN:** Ácido Desoxi ribonucleico
- **AMPK:** AMP-activated protein Kinase
- **AP:** AutoPhagosome
- **ARN:** Ácido RiboNucleico
- **ATM:** Ataxia Telangiectasia Mutated

- **BSA:** Bovine Serum Albumin

- **CCCP:** Carbonil Cianida 3-Clorofenil hidrazona
- **CCL3:** chemokine C-C motif Ligand
- **CCR:** C-C chemokine Receptor
- **CD:** Célula Dendrítica
- **CFSE:** CarboxiFluoresceín diacetato Succinimidil éster
- **CMA:** Autofagia Mediada por Chaperonas
- **CMAC:** 7-Amino-4-Clorometil CuMarina
- **CMTMR:** 5-(y -6) (((4-Clorometil) benzoil) amino) TetraMetil Rodamina
- **Células NK:** células Natural Killer
- **CoQ:** Coenzima Q
- **CPAs:** Células Presentadoras de Antígenos
- **CRAC:** Canales de Calcio Activados por Calcio
- **C-SMAC:** Clúster Central SupraMolecular de Activación
- **CXCR:** C-X Chemokine Receptor

- **DHE:** DiHidroEtidina
- **DUOX:** OXidasas Duales

- **E-64d:** (2S, 3S)-trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-3-metilbutano etil éster
- **EDTA:** EthyleneDiamineTetraacetic Acid

- **FBS:** Fetal Bovine Serum
- **FoxO:** Forkhead box class O

- **G-CSF:** Factor eStimulador de Colonias de Granulocitos
- **GFP:** Green Fluorescent Protein
- **GM-CSF:** Factor eStimulador de Colonias de Granulocitos-Macrófagos
- **GPX:** Glutation PeroXidasa

- **HEV:** High Endotelial Veins
- **HMGB1:** High Mobility Group Box1
- **H₂O₂:** peróxido de hidrógeno

- **ICAM-1:** InterCellular Adhesion Molecule 1

- **IFN:** InterFerón
- **IL:** InterLeuquina

- **LAT:** adaptador para la Activación de Linfocitos T
- **LC:** Célula de Langerhans
- **LC3:** microtubulue-associated protein 1 Light Chain 3
- **LFA-1:** Lymphocyte Function-associated Antigen-1
- **LIR:** LC3 Interacting Region
- **LPS:** LiPopoliSacárido bacteriano

- **M-CSFR:** Factor eStimulador de Colonias de Macrófagos
- **MEFs:** Mouse Embryonic Fibroblasts
- **MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- **MitoQ:** fosfonio [10-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexaniden-1-il) decyl] trifenil metanosulfonato
- **MPTP:** Mitochondrial Permeability Transition Pore
- **MTOC:** Centro Organizador de MicroTúbulos
- **mTOR:** Mammalian Target Of Rapamycin

- **NAC:** N-Acetil Cisteína
- **NLRs:** NOD-Like Receptors
- **NOX:** NADPH Oxidasa

- **PAMPs:** Productos de replicación de PATógenos
- **PAS:** PreAutophagosomal Structures
- **PBS:** Phosphate-Buffered Saline
- **pCD:** Células Dendríticas Plasmacitoides
- **PE:** PhosphatidilEthanolamine
- **PFA:** ParaFormAldehído
- **PG:** Propil Galato
- **PGC-1 α :** Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator 1 α
- **PI(4,5)P2:** fosfatidil inositol 4,5-difosfato
- **PI3K:** PhosphoInositide 3 Kinase
- **PKC:** Protein Kinase C
- **PRR:** Receptor de Reconocimiento de Patógenos
- **Prx:** PeRoXirredoxina
- **P-SMAC:** Clúster Periférico SupraMolecular de Activación

- **O₂^{-•}:** superóxido

- **RE:** Retículo Endoplásmico
- **ROS:** Reactive Oxygen Species

- **S6K:** S6 Kinase
- **SCS:** Seno SubCapsular
- **SEM:** Standar Error of the Mean
- **SI:** Sinapsis Inmunológica
- **SI-CD:** Sinapsis Inmunológica en la Célula Dendrítica
- **SI-T:** Sinapsis Inmunológica en el linfocito T
- **SLRs:** Sequestome 1-Like Receptors
- **SOD:** SuperÓxido Dismutasa

- **TCA:** Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos
- **TCR:** Receptor de la Célula T
- **TECs:** Células Tímicas Epiteliales
- **Tip-DC:** Célula presentadora Productora de TNF- α y de iNOS
- **TLR:** Toll-Like Receptors
- **TNF:** Factor de Necrosis Tumoral
- **TPP:** TriPhenilPhosphonium

- **ULK:** Unc-51 Like Kinase
- **UPR:** Unfolded Protein Response

- **XO:** Xantina Oxidasa
- **XOR:** Xantina OxidoRreductasa

- **ZAP-70:** Zeta-chain-Associated Protein kinase 70